



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

DAYSE CAROLINE SEVERIANO DA CUNHA

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E EFEITOS IMUNOMODULATÓRIO E
ANTIPROLIFERATIVO DE UMA LECTINA DO FUNGO *Clavaria cristata***

NATAL/RN

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DAYSE CAROLINE SEVERIANO DA CUNHA

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E EFEITOS IMUNOMODULATÓRIO E
ANTIPROLIFERATIVO DE UMA LECTINA DO FUNGO *Clavaria cristata***

Dissertação de mestrado apresentada
ao PPg do Departamento de Bioquímica
da Universidade Federal do Rio Grande
do Norte como requisito parcial à
obtenção do título de Mestre em
Bioquímica

**Orientador: Prof. Dr. Maurício Pereira
de Sales (*in memoriam*)**

NATAL/RN

2010

DAYSE CAROLINE SEVERIANO DA CUNHA

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E EFEITOS IMUNOMODULATÓRIO E
ANTIPROLIFERATIVO DE UMA LECTINA DO FUNGO *Clavaria cristata***

Aprovada em: ___/___/___

Dissertação de mestrado apresentada ao PPG do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em bioquímica.

BANCA EXAMINADORA:

Orientador: Prof. Dr. Elizeu Antunes dos Santos
Departamento de Bioquímica - UFRN

Prof^a. Dr. Ilka Maria Vasconcelos
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular – UFC
1º Examinador

Prof. Dr. João Paulo Matos Santos Lima
Departamento de Bioquímica - UFRN
2º Examinador

Ao meu Orientador, Professor e Amigo Maurício Pereira de Sales (in memoriam), exemplo de pesquisador, competência, força e de generosidade. Meu eterno agradecimento pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos, por sempre exigir o melhor de mim e graças a isto está concretizando um sonho... Um sonho que pretendo continuar e sei que sempre me lembrarei do professor e amigo que me ensinou a caminhar no mundo da pesquisa. Sinto-me honrada e orgulhosa por ter participado do seu grupo de pesquisa. Meus sinceros agradecimentos por tudo. Fique com Deus!

Aos meus amados pais, Eliane Severiano da Cunha e Francisco Barbosa da Cunha Sobrinho, por todo apoio e incentivo incondicional, por todo o esforço no intuito de sempre me proporcionarem o melhor durante minha jornada na universidade e por abrirem mão da minha presença, mesmo em momentos tão importantes e necessários. Que Deus os abençoe! Eu amo vocês!

Agradecimentos

É com muita satisfação que escrevo meus agradecimentos à todas as pessoas de extrema importância na minha vida pessoal e profissional que de alguma forma contribuíram para a conclusão de mais essa importante etapa em minha vida.

Primeiramente agradeço a Deus pelas oportunidades proporcionadas em minha vida, por todas as vezes que pedi em oração força para não me deixar desanimar e coragem para seguir em frente, pela fé e luz concedida durante a realização desse trabalho;

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e confiança concedidos durante todos os momentos da minha vida. Amo vocês;

Ao meu querido sobrinho (“meu filho”) Diego Severiano da Cunha Filho por cada sorriso banguelo mais lindo, carinho e momentos de descontração durante a finalização deste trabalho;

Ao meu irmão Diego e minha cunhada Thaís, pelo carinho e por sempre se mostrarem prestativos;

A todos os demais familiares, pelo apoio inegável na concretização dessa jornada;

Ao professor Dr. Elizeu Antunes dos Santos, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pela orientação na finalização deste trabalho, por ter me acolhido sem hesitar como sua aluna de mestrado, pela ajuda e incentivo a este trabalho;

À professora Dra. Adriana Uchôa do Departamento de Biologia Celular e Genética pela co-orientação, pela amizade, pelos conselhos, por estar sempre disposta a ensinar e esclarecer dúvidas, e pelo crescimento profissional e pessoal proporcionados com o seu convívio. Muito obrigada, professora, por também ter me acolhido como sua aluna de mestrado e pela compreensão durante a finalização deste trabalho;

Aos professores componentes da banca de qualificação, Dra. Suely Ferreira Chavante, Dr. Matheus Pedrosa e Dra. Ana Heloneida, pela atenção, esforço e ajuda indispensáveis para o aperfeiçoamento desta dissertação;

À professora Dra. Giulliana Andrade, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pelo apoio e pelos ensinamentos com a cultura de macrófagos, sua ajuda foi de extrema importância;

Ao professor Dr. Iuri Goulart Baseia, do Departamento de Botânica, Ecologia e Zoologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pela identificação do fungo em estudo;

À professora Dra. Luciana da Matta do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pelo apoio, compreensão e ajuda durante as aulas ministradas por mim durante o estágio a docência II;

Aos demais Professores, Luiz, Luciana Guimarães, Edda, Selma, Dilma, Fernanda, Jacira, Hugo, João Paulo, Roberto e Felipe, assim como aos Funcionários do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), em especial a Rogério, Eliene e Jonas, pela preciosa amizade, competência profissional, e que de alguma forma contribuíram para a execução dessa tarefa;

À minha amiga e companheira de toda minha vida acadêmica e além, Dayse Santos, pela sua amizade fiel e leal, por todo o apoio e compreensão, por todas as lágrimas divididas e alegrias duplicadas. Sem sua presença este trabalho teria sido muito mais difícil;

À minha “irmã gêmea” e futura “roommate” Sheyla Varela, pelo companherismo e cumplicidade durante nosso convívio no LQFPB e pela amizade sincera e verdadeira que apesar da distância se fortalece cada vez mais. Muito obrigada pelo apoio e paciência durante a finalização deste trabalho;

Ao meu amigo Jannison pelo companheirismo, por toda a ajuda nos experimentos, nas discussões de resultados e nos momentos de descontração, sem você e suas histórias mirabolantes os dias no LQFPB com certeza teriam sido menos alegres;

À minha amiga Virgínia, pelo apoio, pela ajuda na realização dos experimentos com a cultura de macrófagos, por sempre se mostrar prestativa e pela sua incrível energia contagiante. Muito obrigada, Vivi;

À minha amiga Nathália (naná), pelo incentivo, pelo apoio e pelos momentos de descontração essenciais (momentos Nathália de ser) durante o mestrado e que essa amizade perdure para sempre. Muito obrigada;

A Larissa, que se mostrou uma amiga leal durante o mestrado e para toda a vida, obrigada pela sua companhia agradável;

À queridíssima Luciana Rabelo, pela ajuda e apoio durante a realização dos experimentos;

Aos IC's do LQFPB em especial a Rafaella, Raphael Russi, Wanessa, as “minhas filhas” IC's Thays e Priscila, e ao meu “caçula” Raphael Serquiz (Slave), pelo apoio indispensável no biotério e pela ajuda imprescindível no preparo da cultura de macrófagos;

Aos demais colegas do Laboratório de Química e Função de Proteínas Bioativas, Jacy, Adelianna, Patrícia, Paulinha, Carol, Matheus, Ticiane, Roberta, Phelippe, Jonalson, Annara, Luana, e aos amigos que já passaram pelo LQFPB e que de certa forma contribuíram para realização deste trabalho Richele, Kaline, Fabinho, Cleysyvan, Ludovico, Rodrigo, Ana Celly, Daniele, Katya Anaya, Gioconda Moura, Ibson Lucas, Hugo Henrique, Alexandre Queiroz;

Ao grupo de pesquisa do laboratório de Glicoconjugados Bioativos I (GAGs I), minha segunda casa no departamento, pela ajuda mútua, por vários momentos de descontração e pelos companheiros de pesquisa, como: Dayse Santos, Ana Katarina, professora Adriana Brito, Iuri (gatxinho manhoso), Raquel Helen, Fernanda, “Rominho” e Débora. Obrigada pelos momentos agradáveis durante todo este tempo no DBQ;

A todo o laboratório de Imunogenética (professora Selma), em especial a Virgínia, Daniela, Williane, Carlos, Núbia, Sérgio, Glória por gentilmente sempre nos receber e auxiliar em experimentos, dicas e disponibilidade de uso do seu espaço;

A todo o laboratório de Biologia Molecular e Genômica (LBMG), em especial a Jana, “Fabão”, Juliana, Marcos Felipe e Leonam, pelo apoio e disponibilidade de uso do seu espaço;

Ao grupo de pesquisa BIOPOL ,em especial a Rafael, Leonardo, Jailma, Sara, Ruth e Raniere, pela ajuda e companherismo;

Aos demais colegas de departamento e funcionários, sempre garantindo um ambiente adequado e organizado indispensáveis para o bem estar do nosso cotidiano no ambiente de trabalho;

Às turmas de zootecnia e engenharia de alimentos pela paciência e pela oportunidade concedida durante as aulas ministradas por mim durante o estágio a docência;

Às minhas amigas, as Pandetes: Koka, Bibi, Dayse Santos, Myrian Júlia, Priscila (Centrada) e Tazinha, companheiras durante toda a graduação e amigas para toda a vida;

Ao PPG do departamento de Bioquímica pela oportunidade de concluir minha pós-graduação;

Ao HEMOCENTRO-RN, pela doação das bolsas de sangue;

A coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES), pelo incentivo financeiro durante meu mestrado.

*"Agir, eis a inteligência verdadeira.
Serei o que quiser. Mas tenho que
querer o que for. O êxito está em ter
êxito, e não em ter condições de êxito.
Condições de palácio tem qualquer
terra larga, mas onde estará o palácio
se não o fizerem ali?"*

Fernando Pessoa

"Sonho se realiza com trabalho"

Eliane Severiano da Cunha

RESUMO

Uma lectina de 140,0 kDa foi purificada e caracterizada a partir do extrato protéico do fungo *Clavaria cristata*. O processo de purificação a partir do extrato bruto do fungo compreendeu uma cromatografia de gel filtração SEPHACRYL S200 e uma cromatografia de troca iônica Resource Q em sistema FPLC-AKTA (Fast Protein Liquid Chromatography). A lectina de *C. cristata* (CcL) aglutinou todos os tipos de eritrócitos humanos com preferência pelos do tipo “O” tratados com tripsina. A atividade hemaglutinante de CcL se mostrou dependente do íon cálcio e foi fortemente inibida pela glicoproteína mucina bovina (BSM) até a concentração mínima de 0,125 mg/mL. CcL foi estável numa ampla faixa de pH que variou entre 2,5-11,5 e termoestável até 80°C por uma hora. A massa molecular da CcL, determinada por cromatografia de gel filtração Superose 6 10 300 GL em sistema de FPLC-AKTA foi de aproximadamente 140,3 kDa e uma eletroforese SDS-PAGE revelou uma única banda com massa molecular de aproximadamente 14,5 kDa quando a lectina foi aquecida à temperatura de 100 °C. CcL induziu a ativação de macrófagos murinos *in vitro* com conseqüente liberação de óxido nítrico atingindo a máxima produção de óxido nítrico no tempo de 24 h. Em modelo experimental de edema de pata em camundongos, a lectina do fungo apresentou atividade pró-inflamatória sendo capaz de induzir a formação do edema. A viabilidade celular das linhagens celulares HepG2, MDA 435 e 3T3 foi analisada após incubação por 72 h com concentrações de CcL (0,5-50 µg/mL). O valor do IC₅₀ foi obtido com a concentração de CcL de 50 µg/mL para linhagem de células HepG2. No presente trabalho, os efeitos imunomodulatórios e antiproliferativos foram observados apontando a CcL como um possível imunomodulador, interferindo na resposta imune de macrófagos levando a possíveis efeitos anti-parasitários, anti-tumorais ou agente diagnóstico e/ou terapêutico.

Palavras chaves: Fungo, *Clavaria cristata*, Lectina, Macrófagos, Óxido nítrico, HepG2 , Edema de pata.

ABSTRACT

A 140,0 kDa lectin was purified and characterized from the mushroom *Clavaria cristata*. The purification procedures from the crude extract of the mushroom comprised gel filtration chromatography on Sephacryl s200 and ion exchange on Resource Q column. The purified lectin agglutinated all types of human erythrocytes with preference for trypsinized type O erythrocytes. The haemagglutinating activity is dependent of Ca²⁺ ions and was strongly inhibited by the glycoprotein bovine submaxillary mucin (BSM) up to the concentration of 0,125 mg/mL. The *C. cristata* lectin (CcL) was stable in the pH range of 2,5-11,5 and thermostable up to 80 °C. CcL molecular mass determined by gel filtration on a Superose 6 10 300 column was approximately 140,3 kDa. SDS polyacrilamide gel electrophoresis revealed a single band with a molecular mass of approximately 14,5 kDa, when the lectin was heated at 100 °C in the presence or absence of β-mercaptoethanol. CcL induced activation of murine peritoneal macrophages *in vitro* resulting in the release of nitric oxide (NO), reaching the maximum production at 24 h. In experimental paw oedema model in mice, CcL showed pro-inflammatory activity being able to induce oedema formation. Cell viability of HepG2, MDA 435 e 3T3 cell lines was examined after 72 h of incubation with CcL in different concentrations (0,5-50 µg/mL). CcL inhibited HepG2 cells growth with an IC₅₀ value of 50 µg/mL. In the present work, the observed immunomodulatory and antiproliferative effects indicate CcL as a possible immunomodulator compound, interfering in the macrophages immune response, taking possible anti-parasitic, anti-tumoral effects or diagnostic and/or therapeutic.

Key Words: Mushroom, *Clavaria cristata*, Lectin, Macrophages, Nitric oxide, HepG2, Paw oedema.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Hematopoese.....	16
Figura 2: Fungo <i>Clavaria cristata</i>	31
Figura 3: Inibição da Hemaglutinação do extrato bruto do fungo.....	45
Figura 4: Perfil cromatográfico do extrato bruto do fungo <i>C. cristata</i> , em coluna de exclusão molecular S200.....	46
Figura 5: Perfil Cromatográfico de CcL na coluna de troca iônica Resource Q em sistema de FPLC-AKTA.....	47
Figura 6: Perfil cromatográfico de CcL em coluna de exclusão molecular e determinação da massa molecular.....	49
Figura 7: Eletroforese em gel de Poliacrilamida.....	51
Figura 8: Determinação da massa molecular da CcL através da curva de calibração dos padrões moleculares de proteínas, determinada por SDS-PAGE.....	52
Figura 9: Curva de Dependência da Lectina por Íon cálcio.....	54
Figura 10: Curva de Termoestabilidade da CcL.....	55
Figura 11: Efeito do pH sobre a lectina.....	56
Figura 12: Produção de Óxido Nítrico.....	59
Figura 13: Cinética de tempo da produção de NO por macrófagos.....	60
Figura 14: Edema de pata em camundongo induzido por CcL.....	61
Figura 15: Citotoxicidade da CcL em células HepG2 avaliada pelo teste de redução de MTT.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela1: Atividade Hemaglutinante do Extrato Bruto do Fungo.....	43
Tabela2: Atividade Hemaglutinante do Extrato Bruto do fungo <i>Clavaria cristata</i> na presença de íons bivalentes.....	44
Tabela 3: Purificação da Lectina do Fungo <i>C.cristata</i> em diferentes etapas.	48
Tabela 4: Atividade hemaglutinante de CcL purificada.	53

LISTA DE ABREVIATURAS/ SIGLAS

3T3	Linhagem celular padrão de fibroblastos murino
APC	Célula apresentadora de antígeno
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albumina sérica bovina
BSM	Mucina bovina
CcL	Lectina de <i>Clavaria cristata</i>
ConA	Concanavalina A
CvL	Lectina de <i>Cliona varians</i>
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle's Meio de cultura de células
DRC	Domínio de Reconhecimento a carboidrato
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
HepG2	Linhagem de carcinoma hepatocelular
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
MDA-MB-435	Linhagem de células de carcinoma mamário
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio

NK	Células exterminadoras naturais (<i>Natural killers</i>)
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PSM	Mucina suína
RNS	Espécies reativas do nitrogênio
ROS	Espécies reativas do oxigênio
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
TEMED	N', N', N', N'-Tetrametil-1-2-diaminometano
U.H.	Unidade de hemaglutinação
Ve	Volume de eluição
V₀	Volume de vazio

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS/ SIGLAS	vii
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Sistema imunitário e resposta imune celular	15
1.2. Macrófagos e mecanismos de ativação	18
1.3. Lectinas	22
1.4. Diversidade das lectinas	25
1.5. Lectinas de fungos	27
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo geral	30
2.2. Objetivos específicos	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. MATERIAL	31
3.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO	31
3.1.2. REAGENTES	32
3.1.3. EQUIPAMENTOS	33
3.2. MÉTODOS	34
3.2.1. Extração protéica do fungo <i>Clavaria cristata</i>	34
3.2.2. Dosagem protéica	34
3.2.3 Preparação de eritrócitos para ensaios de hemaglutinação	34
3.2.4. Detecção da atividade hemaglutinante em extratos totais de <i>Clavaria cristata</i>	35
3.2.5 Cromatografia de exclusão molecular Sephacryl S200	36
3.2.6. Cromatografia de troca iônica em Resource Q em sistema de FPLC-AKTA	36
3.2.7. Determinação da massa molecular por cromatografia de exclusão molecular em superose 6 10 300 GL em sistema de FPLC-AKTA	36

3.2.8. Determinação da curva de dependência do íon cálcio	37
3.2.9. Efeito da temperatura sobre a atividade da lectina.....	37
3.2.10. Efeito do pH sobre a atividade da lectina	37
3.2.11. Especificidade da lectina purificada a carboidratos e glicoproteínas	37
3.2.12. Determinação da menor concentração inibitória da glicoproteína	38
3.2.13. Eletroforese em gel de poliacrilamida descontínuo e desnaturante (SDS-PAGE) ..	38
3.2.14 Eletroforese em gel de poliacrilamida descontínuo e não desnaturante (PAGE).....	39
3.2.15. Preparo da cultura de macrófagos para avaliação da indução e produção de óxido nítrico pela lectina.....	39
3.2.16. Ensaio para a medição dos níveis de nitrato/nitrito	40
3.2.17. Cultura de células	41
3.2.18. Ensaio de viabilidade celular	41
3.2.19. Avaliação da ação da CcL sobre o edema de pata em camundongos	42
3.2.20. Análise estatística	42
4. RESULTADOS.....	43
4.1. Detecção da atividade hemaglutinante no extrato bruto do fungo Clavaria cristata	43
4.2. Determinação da especificidade da lectina presente no extrato bruto do fungo.....	44
4.3. Purificação da lectina em cromatografia de exclusão molecular Sephacryl s-200.....	46
4.4. Purificação da lectina por cromatografia de troca iônica, Resource Q em sistema de FPLC-AKTA.....	47
4.5. Determinação da massa molecular da proteína nativa por cromatografia de exclusão molecular em Superose 6 10 300 GL em sistema FPLC-AKTA.....	48
4.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida	50
4.7. Determinação da massa molecular por SDS-PAGE	52
4.8. Atividade hemaglutinante da CcL	53
4.9. Curva de dependência da lectina por íon cálcio.....	54
4.10. Curva de termoestabilidade da CcL.....	55
4.11. Curva de efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante da CcL.....	56

4.12. Inibição da atividade hemaglutinante da CcL por carboidratos e glicoproteínas	57
4.13. Avaliação dos níveis de nitrato/nitrito em cultura de macrófagos	57
4.14. Indução do edema de pata pela CcL	61
4.15. Efeitos da CcL sobre a proliferação celular	62
5. DISCUSSÃO	63
6. CONCLUSÕES	70
7. REFERÊNCIAS	71

1. INTRODUÇÃO

O entendimento da resposta imune a doenças tem alcançado grandes avanços (Tzianabos, 2000). Nos últimos anos, a descoberta de novas moléculas que modulam as respostas biológicas de células imunes as quais mantêm o equilíbrio que rege uma resposta adequada do hospedeiro a organismos infecciosos ou outros tipos de enfermidades tais como: o câncer, em que as defesas do hospedeiro apresentam-se frequentemente fracas e imunossuprimidas (Hadden, 2003; Ohm; Carbone, 2001), têm atraído o interesse de pesquisadores. Esses compostos são classificados como imunomoduladores e, embora os seus mecanismos de ação ainda não sejam totalmente esclarecidos, um dos mecanismos primários envolve a indução não-específica do sistema imune (Tzianabos, 2000). O mecanismo básico dos efeitos imunomodulatórios, antitumorais, bactericidas e outros efeitos terapêuticos destes compostos provavelmente ocorre através da via de estimulação de macrófagos e modulação do sistema complemento (Chihara, 1992; Wang *et al.*, 1997). Conseqüentemente, a modulação da imunidade inata tem um impacto na habilidade do hospedeiro para responder rápido e potencialmente a um arranjo diverso de patógenos (Beutler, 2004).

A utilização de cogumelos medicinais e produtos naturais acompanha o homem há milênios, e o interesse pelas suas propriedades biomédicas vem crescendo progressivamente em todo o mundo tornando-se necessária a investigação destas fontes naturais para compreender melhor seus mecanismos de ação. Neste sentido, vários ensaios têm sido realizados com o intuito de observar tais efeitos, principalmente com relação ao sistema imunológico (Mainardi; Kapoor; Bielory, 2009; Sforcin, 2007).

A atividade imunomodulatória apresentada por compostos isolados de macrofungos medicinais pode ser observada sobre células efetoras imunes tais como células tronco hematopoiéticas, linfócitos, macrófagos, células T, células dendríticas e células exterminadoras naturais (*Natural Killers*) envolvidas na imunidade inata e adquirida, resultando na produção de citocinas. Os efeitos terapêuticos desses compostos tais como atividade antitumoral, anti-infecciosa e supressão de doenças autoimunes têm sido associados em muitos casos com seus efeitos imunomodulatórios. Levando em consideração que imunomoduladores podem ser

agentes efetivos no tratamento e na prevenção de doenças e devido ao aumento de doenças envolvendo disfunção do sistema imune, câncer e doenças infecciosas.

Nos últimos anos, pesquisadores têm demonstrado interesse na imunoterapia assim como na descoberta de novos potenciadores imunes, compostos com maior eficácia em tratamentos, visando menos efeitos colaterais, bem como a diminuição da resistência a patógenos ou sem afetarem a divisão celular normal especialmente para agentes anticâncer e antivirais (Moradali *et al.*, 2007). Dentre esses compostos, peptídios, lipopolissacarídeos, glicoproteínas, derivados lipídicos, várias proteínas (Tzianabos, 2000), dentre elas, as lectinas, provenientes de uma variedade de organismos incluindo animais, vegetais e fungos, têm sido caracterizados como possuindo efeitos potentes no sistema imune e que podem ser classificados como imunomoduladores ou modificadores da resposta imunológica (Tzianabos, 2000). Dessa forma, a pesquisa por lectinas presentes nos fungos e que apresentam características diversificadas, intensifica o interesse pela descoberta dessas moléculas em novas espécies de fungos.

A espécie *Clavaria cristata*, objeto de estudo deste trabalho, é encontrada em florestas tropicais, onde são importantes na reciclagem da matéria orgânica vegetal. Com o intuito de ampliar o conhecimento da diversidade de lectinas presentes no Reino Fungi com propriedades biológicas importantes para o avanço da pesquisa na área biomédica, *C. cristata* foi selecionada por não haver relatos na literatura sobre a descrição de lectinas nesta espécie. Considerando a indução da produção de óxido nítrico via ativação de macrófagos por algumas lectinas, as possibilidades de envolvimento de óxido nítrico em efeitos antiparasitários e antitumorais em animais, e a atividade antiproliferativa encontrada em algumas lectinas, torna-se de grande interesse investigar lectinas de fungos com potenciais atividades biológicas e aplicações terapêuticas.

1.1. Sistema imunitário e resposta imune celular

Ao longo de sua história evolutiva, os animais têm sido infectados por microrganismos. Em resposta, desenvolveram uma série de defesas tais como: barreiras físicas e químicas, como a pele e superfícies mucosas, que confinam os microrganismos às superfícies externas do corpo e, quando os patógenos conseguem romper essas barreiras, são procurados e destruídos pelo sistema imunitário. Dessa forma, o objetivo do sistema imune é reconhecer o patógeno, impedir sua disseminação e, finalmente, eliminá-lo. Graças a esse sistema, os animais também possuem a capacidade de se proteger de células cancerosas. Participam do sistema imunitário, numerosos tipos de células e uma variedade de moléculas protéicas como componentes do sistema complemento, fatores de crescimento e moléculas de adesão, além de mediadores inflamatórios que modulam a resposta imune, como citocinas, quimiocinas e espécies reativas do oxigênio (ROS) e do nitrogênio (RNS).

As células do sistema imunitário estão normalmente presentes como células circulantes no sangue e na linfa, como coleções definidas anatomicamente nos órgãos linfóides e com células dispersas virtualmente em todos os tecidos. Como todas as células sangüíneas, as células do sistema imunitário também possuem origem na medula óssea, onde muitas também amadurecem. As células tronco hematopoiéticas da medula originam células precursoras, agrupadas em três grupos de células progenitoras especializadas: progenitor linfóide e progenitor mielóide, que darão origem aos leucócitos ou glóbulos brancos, e o progenitor eritróide, que dará origem aos eritrócitos ou glóbulos vermelhos. O progenitor linfóide se divide e se diferencia para dar origem aos linfócitos (células B, células T e células NK). O progenitor mielóide se divide e se diferencia para produzir pelo menos seis tipos celulares: os granulócitos (neutrófilo, eosinófilo e basófilo); o mastócito, a célula dendrítica e o monócito circulante, que origina os macrófagos residentes nos tecidos. O progenitor eritróide origina os eritrócitos e os megacariócitos (Janeway; Medzhitov, 2002) (Fig. 1).

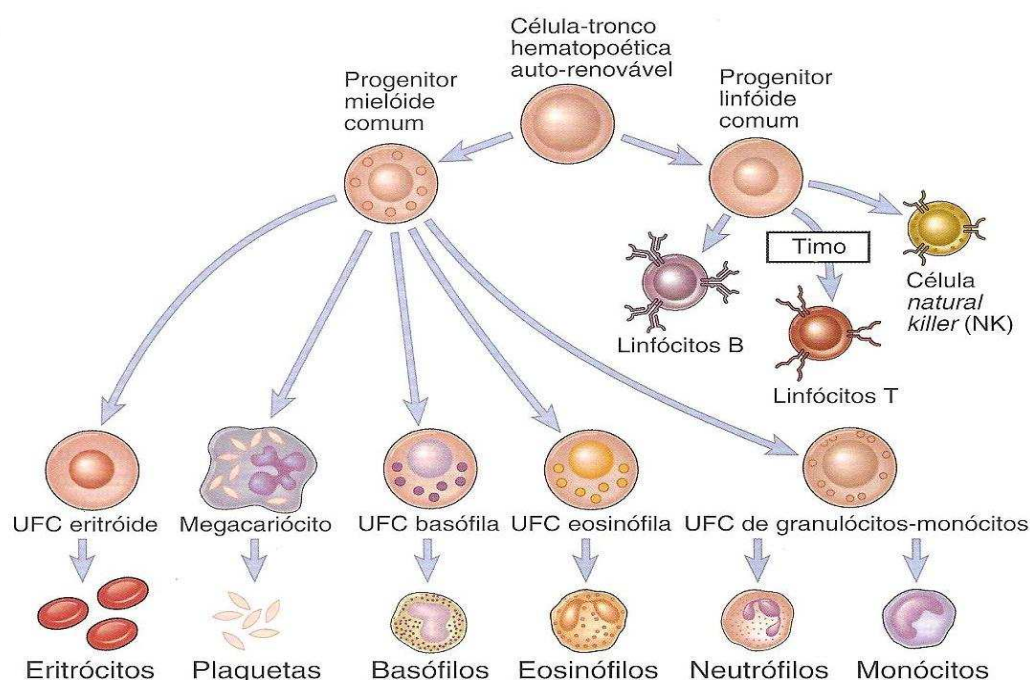


Figura 1: Hematopoese. O desenvolvimento das diferentes linhagens de células sanguíneas está esquematizado nesta "árvore hematopoética". Fonte: ABBAS; LITCHMAN;PILLA. *Imunologia celular e molecular*.6ª Edição. 2008.

Há vários tipos de resposta imune. De uma maneira mais ampla, os diferentes tipos de respostas imunes enquadram-se em duas categorias: respostas inatas ou nativa (imunidade natural) e respostas imunes específicas ou adaptativas (imunidade adquirida) (Roitt; Brostoff; Male, 1999).

A imunidade natural é o mecanismo de defesa que um organismo dispõe antes de entrar em contato com qualquer substância estranha (Seadi, 1998). Esta é a principal linha de defesa contra os organismos invasores e a primeira resposta a um ataque microbiano. Os mecanismos da imunidade inata são rápidos, fixos em seu modo de ação e efetivos em interromper a maioria das infecções em um estágio precoce, no entanto, nem sempre têm a capacidade de eliminar a infecção. Suas características são aquelas que ele apresenta por toda vida, não tendo especificidade nem memória. Os componentes da imunidade inata são barreiras mecânicas, produtos celulares secretados, além de incluir fagócitos mononucleares e células *Natural Killer*. Nesses também são incluídas proteínas como os componentes do complemento, os quais são moléculas solúveis porque estão dissolvidas nos fluidos corporais, ao invés

de estarem associadas ou estocadas em células (Wood; Austyn, 1993). A resposta imune inata não só exerce uma função protetora importante, como também serve para iniciar e regular a subsequente resposta imune adquirida (Abbas; Lichtman; Pober, 2000).

A imunidade adquirida possui muito de seus mecanismos necessários para eliminar invasores, da imunidade natural. Esses mecanismos são amplificados e potencializados, tendo ainda o acréscimo de duas propriedades importantes: a alta especificidade e a memória. Assim, podem ser rapidamente reativados em um encontro futuro com o mesmo patógeno, fornecendo imunidade duradoura a muitas doenças comuns (Parham, 2001).

A imunidade adquirida pode ser dividida em duas grandes classes: (1) resposta imune mediada por anticorpos ou humoral, onde o reconhecimento específico do antígeno na fase efetora é mediado pela ligação das moléculas do anticorpo secretado ao antígeno e (2) resposta imune mediada por células, a qual é dirigida para as células que portam antígenos estranhos na sua superfície, ou que estejam nas proximidades destas. A resposta mediada por células é fisiologicamente mais importante para erradicar micróbios ou vírus que vivem intracelularmente (Alberts *et al.*, 1997; Abbas; Lichtman; Pober, 2000).

O primeiro passo crucial na imunidade adaptativa é a ativação de células T virgens antígeno-específicas pelas células apresentadoras de antígeno especializadas (APCs). Isso ocorre nos tecidos linfóides e órgãos pelos quais passam, constantemente, as células T virgens. A característica mais diferenciada das células APCs é a manifestação de atividades co-estimuladoras, e as moléculas B7.1 e B7.2. Os três tipos de células que podem servir como célula apresentadora de antígeno profissional são os macrófagos, as células dendríticas (também derivadas de monócitos) e as células B, cada uma com funções diferentes na indução da resposta imune. A ativação das células T por uma célula apresentadora de antígeno especializada leva à sua proliferação e à diferenciação de sua progênie em células T efetoras. A proliferação e a diferenciação das células T dependem da produção de moléculas chamadas citocinas, como o fator de crescimento da célula T (interleucina-2), e de sua ligação a um receptor de alta afinidade na célula T ativada. As células T

efetoras podem mediar uma variedade de funções, as mais importantes sendo a citólise das células infectadas pelas células T CD8 citotóxicas e a ativação de macrófagos pelas células Th1, armando, em conjunto, a imunidade mediada por células, e a ativação de células B (Janeway; Medzhitov, 2002).

1.2. Macrófagos e mecanismos de ativação

O sistema fagocitário mononuclear representa a segunda maior população celular do sistema imunitário e consiste de células que têm uma linhagem comum cuja principal função é a fagocitose. Após a maturação e subsequente ativação, podem apresentar várias morfologias. O tipo celular indiferenciado que penetra no sangue periférico após deixar a medula é chamado monócito. Uma vez fixados em tecidos amadurecem e tornam-se macrófagos (Abbas; Lichtman; Pober, 2000).

Os macrófagos (MO) são células da imunidade inata com funções bem estabelecidas na resposta primária a patógenos e também na homeostase tissular, coordenação da resposta imune adaptativa, inflamação, resolução e reparo. Essas células reconhecem sinais danosos através de receptores capazes de induzir programas de ativação especializados (Martinez; Helming; Gordon, 2009). A ingestão de partículas estranhas e seu processamento levam à ativação do sistema imunitário através da apresentação de antígenos aos linfócitos, da secreção de substâncias (como citocinas e quimiocinas) capazes de regular o sistema imunitário e da elaboração de substâncias capazes de destruir outras células e microrganismos (Abbas; Lichtman; Pober, 2000).

Os macrófagos foram primeiramente descritos por Metchnikoff (1905), no início do século XIX. É o grupo mais importante de células fagocitárias de vida longa, compreende a linhagem fagocítica mononuclear, que inclui os monócitos, os fagócitos residentes nos tecidos ou fixados à camada endotelial de capilares sanguíneos (Roitt; Brostoff; Male, 1999).

Ontogeneticamente, os macrófagos são originários de células precursoras do saco vitelínico, migrando para o fígado, baço e medula óssea antes e logo após o nascimento. Nos indivíduos adultos, os macrófagos têm origem em uma célula pluripotente mielóide, presente na medula óssea, a partir da qual são originadas diferentes células progenitoras, entre elas as “unidades formadoras de colônia” de

granulócitos e monócitos (CFU-GM). As CFU-GM dão origem aos pró-monócitos que já apresentam capacidade de pinocitose e expressam uma série de receptores característicos de macrófagos. Os pró-monócitos, por sua vez, dão origem aos monócitos, que saem da medula óssea e ganham a circulação sanguínea. Os monócitos permanecem na circulação por cerca de 1-3 dias, de onde migram para os diversos tecidos, onde se diferenciam formando uma população residente de macrófagos, com tempo de vida variando entre 2 e 4 meses (Nelson *et al.*, 1990; Neveu, 1996). Após penetrar nos tecidos, começam a aumentar de tamanho, e seu diâmetro pode aumentar até cinco vezes. Verifica-se, também o desenvolvimento de número extremamente grande de lisossomos no seu citoplasma, conferindo-lhe aspecto de saco repleto de grânulos. Nesse estágio, tornam-se extremamente capazes de combater agentes infecciosos nos tecidos. Macrófagos residentes no tecido foram previamente chamados de macrófagos fixos e, aqueles que se desenvolviam com resultado de um estímulo exógeno e migravam para sítios particulares, foram denominados macrófagos livres. Estes nomes têm sido substituídos por macrófagos residentes e macrófagos ativados, respectivamente (Gartner; Saad; Hiatt, 1997). Macrófagos ativados são um pouco maiores que os não ativados, principalmente devido ao aumento de volume citoplasmático (Stites; Terr, 1992). Têm sua atividade metabólica, motilidade e atividade fagocítica rapidamente aumentada (Erwig *et al.*, 1998) sendo muito mais eficientes em destruir bactérias e outros patógenos. A variabilidade de estímulos que pode ativar macrófagos é muito grande: contato direto com microrganismos ou partículas inertes, com lipopolissacarídeos (LPS) bacteriano, produtos do próprio tecido danificado, com componentes protéicos do sistema complemento ou da coagulação sanguínea. A ativação pode também ser induzida por certas citocinas que podem ser secretadas por linfócitos que estejam ao redor (Stites; Terr, 1992). Estes estímulos fazem com que o macrófago modifique algumas de suas propriedades tais como: crescimento, diferenciação, ativação, migração, endocitose e secreção (Gordon *et al.*, 1988)

Os macrófagos estão envolvidos em diversos processos como remodelamento tecidual durante a embriogênese, reparo de ferimentos, remoção de células senescentes após injúrias ou infecções, hemopoiese e homeostase, além de fornecer

uma linha de defesa contra invasores microbiais e reconhecer e destruir células tumorais (Hong *et al.*, 2005)

Os macrófagos estão envolvidos em todas as fases das respostas imunes. Primeiro, eles atuam como um mecanismo protetor rápido capaz de responder antes que ocorra a amplificação mediada pela célula T. Posteriormente, os macrófagos podem tomar parte na iniciação da ativação das células T através do processamento e da apresentação de antígenos. Finalmente, eles são importantes como células inflamatórias, tumorícidas e microbicidas na fase efetora da resposta celular, após a ativação mediada por célula T (Roitt; Brostoff; Male, 1999). A idéia de que os macrófagos são importantes na resposta imune foi reforçada nos anos 70 quando se descobriu que macrófagos apresentavam moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II, que são necessárias para o reconhecimento de antígenos pela célula T. Mais tarde, descobriu-se que macrófagos podiam produzir moléculas solúveis ou citocinas, chamadas de “fator de ativação de linfócito”, conhecidas agora por interleucina-1 (IL-1), as quais podem levar à proliferação linfocitária, em parte pela estimulação de outra citocina, a IL-2, de ativação de células T (Wood; Austyn, 1993). Entre as células que comumente apresentam antígenos às células T, os macrófagos expressam apenas baixo nível de moléculas da classe II, até que sejam estimuladas a fazê-lo pelo interferon-gama (IFN- γ) ou por outras citocinas (Abbas; Lichtman; Pober, 2000).

Os macrófagos internalizam, processam, digerem e apresentam o antígeno aos linfócitos, os quais irão produzir moléculas que irão desencadear respostas em outras células. Por outro lado, os linfócitos também vão produzir mensagens aos macrófagos, ativando-os, ou seja, potencializando sua ação (Stites; Terr, 1992). Essa ativação pelos linfócitos ativados bem como a resposta a estímulos externos, provenientes de alguns microrganismos, faz com que os macrófagos modifiquem algumas de suas propriedades, tais como: habilidade para aderir e espalhar-se em substratos, a taxa de endocitose e fusão de lisossomos com vacúolos endocíticos (Venkata-Reddy; Gangadharam, 1992). Em resposta a estes estímulos, estas células sofrem uma ativação que lhes permite, entre outras funções, adquirir uma grande capacidade de matar microrganismos e algumas células tumorais. Isso pode ocorrer através de

mecanismos oxigênio ou nitrogênio dependentes, nos quais espécies reativas do oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) são produzidos (Wood; Austyn, 1993). Estes produtos difusíveis e de vida curta tem papéis na defesa antimicrobiana tão bem definida como bem sinalizada na célula (Han *et al.*, 2001).

Espécies reativas do nitrogênio (RNS) como Óxido Nítrico (NO) e peroxinitrito (ONOO⁻), podem agir como segundo mensageiro modulador das vias de sinalização redox em macrófagos (Forman; Torres, 2001). ROS e NO podem interagir de diferentes maneiras e agir sinergisticamente causando citotoxicidade. Os radicais NO e O₂⁻ (superóxido) reagem para formar peroxinitrito (ONOO⁻), um poderoso oxidante o qual é capaz de nitrar proteína, enfraquecendo, desse modo, a atividade de diferentes enzimas mitocondriais, levando a uma diminuição nos níveis de energia (Cadenas; Cadenas, 2002). O óxido nítrico é uma molécula biológica pleiotrópica envolvida em uma miríade de processos patológicos e fisiológicos (Son *et al.*, 2006), tais como regulação da pressão sanguínea, neurotransmissão, transdução de sinal, defesa antimicrobiana (Macmicking; Xie; Nathan, 1997; Schoedon *et al.*, 1995) imunomodulação (Gomez-Flores; Weber, 1998), regulação redox celular (Forman; Torres, 2001; Kim; Ponka, 2002) e apoptose (Albina; Reichner, 1998). Uma vez produzido, o óxido nítrico tem um tempo de meia vida curto e sofre oxidação espontânea para metabólitos inativos, nitrito e nitrato (Farzaneh-Far; Moore, 2001).

Em sistemas biológicos, o NO é um mediador diatômico gerado pela oxidação de L-arginina por uma reação oxidativa de cinco elétrons, na presença de oxigênio molecular e NADPH, catalisada pela família de isoenzimas óxido nítrico sintase (NOS) (Rawlingson *et al.*, 2003). Duas destas são constitutivamente expressas em células do endotélio vascular (eNOS ou NOS tipo III) e em neurônios (nNOS ou NOS tipo I), enquanto que a expressão da terceira isoenzima (iNOS ou NOS tipo II) é induzida, em uma variedade de células, por produtos de bactérias Gram-negativas (endotoxinas) e bactérias Gram-positivas. eNOS e nNOS são transitoriamente ativadas em respostas ao aumento intracelular dos níveis de cálcio e estão envolvidas na regulação das funções fisiológicas, enquanto que iNOS é expressa e continuamente ativa durante inflamações, onde está envolvida a defesa do hospedeiro contra patógenos. iNOS tende a produzir altas concentrações de NO na célula, o qual possui um papel anti-

inflamatório, por suprimir infecções bacterianas e acentuar recrutamento de leucócitos (Cadenas; Cadenas, 2002).

A ativação de macrófagos é essencial para cumprir seu papel na defesa do hospedeiro. Então, compostos que modulam as funções dos macrófagos, atuando como imunomoduladores, aumentando ou prolongando a duração da resposta imune específica, são de grande interesse (Muller *et al.*, 1996). Dentre esses compostos, encontram-se as lectinas, uma classe de proteínas que nos últimos anos, têm despertado um interesse crescente, devido ao seu papel na aglutinação, toxicidade, atividades anti-proliferativa, antitumoral, imunomodulatória, antifúngica e antiviral em diferentes linhagens celulares (Yan *et al.*, 2010).

1.3. Lectinas

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não-imune que reconhecem e se associam de forma reversível, com alta afinidade e especificidade a carboidratos não apresentando atividade enzimática. Elas apresentam um ou mais sítios de interação por subunidade, que pode ligar-se reversivelmente a segmentos glicídicos específicos, através de pontes de hidrogênio e interações de Van Der Waals (Gabiús *et al.*, 2002; Lis; Sharon, 1998; Loris, 2002; Peumans; Van Damme, 1995). Essas proteínas interagem com os segmentos glicídicos através de uma região denominada de domínio reconhecedor de carboidratos (DRC), que é altamente conservada em cada tipo de lectina (Ni; Tizard, 1996). Ao interagirem com glicoconjugados de superfície celular, as lectinas podem promover a formação de ligações cruzadas entre células adjacentes, desencadeando o processo denominado aglutinação (Peumans; Van Damme, 1995). Um desses processos de aglutinação comumente utilizado desde o século passado, quando inicialmente foi observado por Stillmark (1888), para detecção de lectinas em um extrato protéico foi a sua capacidade de aglutinar eritrócitos, denominado hemaglutinação. Este processo se deve graças aos glicoconjugados presentes nos eritrócitos localizados sobre o segmento N- terminal externo da Glicoforina A (GPA), maior sialoglicoproteína transmembranar dos eritrócitos, correspondendo a 2-4% das proteínas de membrana. Em geral, as glicoforinas têm três domínios: um domínio externo, onde estão os oligossacarídeos, um segmento incluído no interior da bicamada e um segmento interno citoplasmático. A concentração de GPA

sobre as hemácias é responsável por 80% da carga negativa destas células em função da sua constituição bioquímica composta de ácido siálico e carboidratos terminais. Essa superfície negativa celular ajuda a minimizar a interação célula-célula e prevenir a aglutinação eritrocitária. A GPA é suscetível à clivagem pela enzima tripsina, ficina e papaína na região próxima à membrana eritrocitária (Murador; Deffune, 2007). Assim, enzimas disponíveis comercialmente (tripsina, papaína etc) são usadas para modificar a superfície de células de eritrócitos humanos em graus variados, permitindo o acesso de lectinas. O aumento da aglutinação após o tratamento com protease é devido tanto a uma diminuição da carga negativa líquida como a uma remoção de peptídeos e glicopeptídeos da superfície da célula que podem, por impedimento estérico, dificultar a reação de aglutinação (Schnebli; Roeder; Tarcsay, 1976). Além disso, algumas lectinas necessitam de íons como cálcio e magnésio para desempenhar ou potencializar sua função. A ocupação dos sítios metálicos por esses íons causa uma modificação na conformação estrutural da molécula, conferindo o reconhecimento ao carboidrato pelo qual tem afinidade, estabilizando a ligação ao sítio ligante e fixando as posições dos aminoácidos que interagem com o carboidrato ligante. As aglutininas que não requerem íons metálicos já possuem conformação estrutural necessária para este reconhecimento (Sharon; Lis, 1990).

Devido à sua capacidade de interagir com glicoconjugados, seja em solução ou em superfície celular, as lectinas atuam mediando uma ampla variedade de funções biológicas, como: reconhecimento de células-alvo, adesão celular, interação entre células, interação entre célula-matriz, fertilização, aglutinação de células e bactérias (Gabiús, 1997). A especificidade das lectinas para diferentes carboidratos possibilitam a sua utilização em diversas pesquisas biológicas e médicas, pois as tornam poderosas ferramentas nos processos de purificação e caracterização de polissacarídeo ou glicoconjugados, caracterização de grupos sanguíneos, caracterização dos estágios de desenvolvimento de microrganismos, diferenciação de células patogênicas e identificação de células malignas (Liener; Sharon; Goldstein, 1986; Matsui *et al.*, 2001). De acordo com esta última propriedade, as lectinas podem reconhecer e se ligar a receptores presentes na membrana de células cancerígenas promovendo citotoxicidade, apoptose e inibição do crescimento do tumor (De Mejia; Prisecaru,

2005). Diferenças na especificidade das lectinas para diferentes linhagens de células tumorais têm sido documentadas (Dhuna *et al.*, 2007; Kiss *et al.*, 1997). O modo de ação das lectinas nas células tumorais depende do tipo de tumor, a fonte de lectina e sua atividade biológica. Algumas teorias sugerem que a aglutinação causa redução da divisão celular, aumento do número de macrófagos, intensificando a susceptibilidade das células tumorais ao ataque de macrófagos, e melhora da imunocompetência do hospedeiro. As lectinas também podem penetrar na célula, resultando em aglutinação de células cancerígenas, além de muitas outras propriedades antitumorais, como a ativação de certas proteínas quinases (Roy *et al.*, 2010).

A especificidade das lectinas é definida em termos do glicoconjugado ou monossacarídeo que apresenta maior ação inibitória. Algumas lectinas têm sido relatadas com atividade hemaglutinante não afetadas por açúcares simples e inibidas somente por glicoproteínas, como ácido siálico. As lectinas que reconhecem ácido siálico são encontradas em vertebrados, artrópodes, moluscos, protozoários, plantas, bactérias, vírus (Kobayashi, *et al.*, 2004) e fungos, e algumas delas têm sido utilizadas na pesquisa médica e biológica. As sialoglicoproteínas diferem na composição do ácido neuramínico e seus derivados (Denis *et al.*, 2003). Os ácidos siálicos mais comuns são N-acetil-neuramínico e o N-glicolil-neuramínico presente em grande parte em mucinas de origem bovina e suína.

Mucinas são glicoproteínas secretadas pelos organismos para proteger e lubrificar a superfície de células epiteliais de injúrias biológicas, químicas e mecânicas. Mucinas e moléculas tipo mucinas existem como moléculas solúveis ou presas a membrana e estão envolvidas na modulação da resposta imune, inflamação, adesão e tumorigenese (Andrianifahanana; Moniaux; Batra, 2006). Glicoproteínas tipo mucina parecem desempenhar um papel na interação leucócito – endotélio, provavelmente devido à presença de selectinas ligantes a carboidratos (Olson; Singbartl; Ley, 2002; Tedder, *et al.*, 1995).

1.4. Diversidade das lectinas

Abundantes na natureza, as lectinas são encontradas em uma variedade de organismos, incluindo animais, plantas, fungos, bactérias, protistas e vírus (Nagata *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1995). Essas proteínas apresentam uma diversidade de atividades biológicas importantes incluindo: antimicrobiana, anticâncer, imunomoduladora e inseticida (Li *et al.*, 2008).

Em bactérias, protozoários e vírus, há evidências de que as lectinas desempenham um papel auxiliar e/ou promovem a adesão destes microrganismos às estruturas celulares de seus hospedeiros, um pré-requisito para que a infecção ocorra (Lis; Sharon, 1998). Em trabalho desenvolvido por Glick e colaboradores (1991), foi constatado que na infecção causada pelo vírus da influenza, o processo de adesão viral à célula alvo era mediado por uma lectina que se liga a resíduos de ácido siálico (ácido N-acetil-neuramínico) presentes na face externa da membrana celular (Glick *et al.*, 1991). Muitos membros de enterobactérias possuem lectinas na sua parede que permitem o sucesso da adesão ao epitélio intestinal, conduzindo a infecções no trato urinário e gastrointestinal (Ofek; Sharon, 1990). Uma lectina isolada da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* se liga à superfície das células do hospedeiro, causando danos aos tecidos de pacientes infectados (Gilboa-Garber; Sudakevitz, 1999).

Peumans e Van Damme (1995) estudaram a ocorrência de lectinas em plantas superiores e observaram que estas proteínas já haviam sido detectadas em cerca de 500 espécies. Muitas das lectinas vegetais são encontradas nas sementes, embora sua presença já tenha sido observada em todos os tipos de tecidos vegetais, como casca, folha, caule, frutos e raízes. Dentre as várias hipóteses propostas sobre as funções das lectinas em plantas, três são atualmente mais aceitas. A primeira assume a possível participação dessas proteínas nas relações simbióticas entre plantas fixadoras de nitrogênio e bactérias, um processo de importância crucial no ciclo de nitrogênio terrestre. No entanto, essa hipótese fica restrita apenas à família de lectinas de leguminosas que representa a família melhor estudada (Lis; Sharon, 1998). A segunda hipótese se enquadra de maneira mais geral e pressupõe que as lectinas vegetais são agentes de defesa contra microrganismos fitopatogênicos, insetos fitófagos e animais herbívoros (Rudiger, 1998). Também foi mostrado que lectinas de plantas possuem

propriedades citotóxica, antifúngica e anti-helmíntica (nematóides) tanto *in vitro* quanto *in vivo* e são tóxicas para animais superiores (Oka; Chet; Spiegel, 1997; Oliveira *et al.*, 1994; Ripoll *et al.*, 2003) A terceira hipótese sugere que essas moléculas poderiam funcionar como substâncias de reserva, uma vez que, em algumas sementes de plantas, as lectinas representam a principal fração de proteínas solúveis (Peumans; Van Damme, 1995). Nesta hipótese, as lectinas são degradadas durante a germinação, contribuindo, assim, para o seu conjunto nutricional.

Nos vertebrados distinguem-se duas categorias de lectinas: as citoplasmáticas, que são extraídas em soluções aquosas ou salinas, e as lectinas de membrana que requerem o uso de detergentes para sua solubilização. Muitas das lectinas ligadas à membrana são receptores para ligantes fisiológicos, como o receptor manose-6-fosfato que liga enzimas lisossomais (Kornfeld, 1987), e receptores para asialoglicoproteínas, que ligam asialoglicoproteínas do soro (Ashwell; Harford, 1982) Embora as lectinas presentes nos animais apresentem uma incontestável variedade de funções, a maioria delas é considerada molécula de reconhecimento, uma vez que age no processo de defesa contra patógenos e participa do tráfego celular, (Kilpatrick, 2002).

Apesar de estudos extensivos serem realizados em lectinas de plantas e animais, pouca informação ainda está disponível em relação às lectinas de fungos. Porém, na última década, essas proteínas têm atraído a atenção dos pesquisadores devido às suas atividades antitumorais, antiproliferativas e imunomoduladoras. Mais recentemente, há vários relatos de sua ocorrência em fungos inferiores e patogênicos, nos quais vários papéis têm sido sugeridos, dentre estes, no comportamento parasitário, envolvendo plantas (Hohl; Balsiger, 1986) ou insetos (Ishikawa, 1983) e na predação por muitas espécies de nematódeos do solo (Rosenzweig; Ackroyd, 1983), mas seu papel fisiológico ainda permanece incerto (Konska *et al.*, 1994).

Vários papéis têm sido postulados para lectinas de fungos; alguns deles parecem relacionar-se ao próprio metabolismo do fungo, enquanto que outras atividades estão implicadas nas relações parasitárias e simbióticas com outros organismos.

1.5. Lectinas de fungos

Historicamente, cogumelos medicinais (Basidiomicetos) têm demonstrado profundos benefícios à saúde. Estudos recentes estão identificando muitas moléculas bioativas presentes neles, confirmando sua eficácia na medicina. A maioria das espécies é pouco encontrada e foram coletadas de florestas onde crescem em árvores vivas ou mortas ou em solo onde se encontra matéria orgânica vegetal (Smith; Rowan, 2002).

A aplicação dos fungos como medicamento remonta a 3000 a.C quando macrofungos foram usados como medicamento para doenças, especialmente na terapia oriental tradicional, e depois da descoberta da penicilina (1929), fungos foram considerados como fontes ricas de antibióticos naturais e outros compostos bioativos. Macrofungos tais como *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes*, *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis officinalis* e muitos outros têm sido usados no tratamento de diferentes doenças por centenas de anos na China, Japão, Coréia e regiões eslavas (Wasser, 2002). Moléculas constituintes de macrofungos são conhecidos como compostos bioativos pertencentes a classe dos polissacarídios, glicoproteínas, proteoglicanos, terpenóides, ácidos graxos, proteínas, lectinas que possuem certas propriedades medicinais.

A descoberta de lectinas de fungos teve início a partir da pesquisa em toxicologia de fungos superiores seguindo a mesma linha de pesquisa usada em sementes, para detecção de toxinas com propriedades de aglutinar eritrócitos, como exemplo, a ricina em *Ricinus communis* (Stillmark, 1888), propriedades que estavam também sendo vistas nos fungos (Guillot; Kanska, 1997), sendo a primeira hemaglutinina de fungo a ser descoberta pertencente ao cogumelo *Amanita muscaria* (Ford, 1910)

Nos fungos, as lectinas apresentam provavelmente um importante papel na dormência, crescimento e morfogênese; mudanças morfológicas conseqüentes de infecções parasitárias e reconhecimento molecular durante os estágios primários da micorrização.

São encontradas diversas aplicações de lectinas de fungos nos estudos taxonômicos, embriológicos e bacteriológicos, em estudos de modificação de

glicoconjugados nas membranas e formação de câncer, classificação celular, seleção de células mutantes ou tumorais e isolamento de glicoconjugados de membrana e do soro (Guillot; Kanska, 1997).

Guillot e Konka (1997) citaram um número de lectinas de fungos como exemplos para ilustrar que cromatografias de afinidade, troca iônica e gel filtração podem ser usadas para seu isolamento. Eles concluíram ainda que estas lectinas apresentam diferenças no número de subunidades (1-5), massa molecular (abrangendo 12 a 190 kDa), conteúdo de carboidratos (0-18%), composição de aminoácidos, ponto isoelétrico, especificidade a carboidratos e especificidade frente a eritrócitos humanos.

As lectinas de fungos têm atraído a atenção de pesquisadores por apresentarem uma variedade de aplicações biomédicas. Lectinas presentes nos cogumelos *Agaricus bisporus*, *Boletus satanus*, *Flammulina velutipes*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola fronsosa*, *Tricholoma mongolicum* e *Volvariella volvacea* apresentam atividades biológicas importantes tais como: citotoxicidade, antitumoral e imunomodulatória (Wang; Ng; Ooi, 1998).

A lectina de *Agaricus bisporus* (ABL) é uma mistura de duas lectinas, lectina A e lectina B com especificidades similares para receptores de carboidratos da superfície celular (Kawagishi, 1988; Presant; Kornfeld, 1972) ABL, inibe a proliferação de células epiteliais alcançando o papel de potencial agente no tratamento anticâncer. A seqüência N-terminal da lectina do fungo *Boletus edulis* é semelhante à da ABL apesar de serem bem diferentes em massa molecular, número de subunidades e especificidade a açúcares (Sueyoshi; Tsuji; Osawa, 1985).

A lectina isolada de *Boletus edulis* apresenta uma especificidade única frente aos açúcares xilose e melibiose. Sua natureza dimérica está de acordo com relatos de lectinas diméricas de *Tricholoma mongolicum* (Wang, *et al.*, 1995), *Pleurotus ostreatus* (Wang; Gao; Ng, 2000) *Agrocybe cylindracea* (Wang; Ng; Liu, 2002), *Coprinus cinereus* (Cooper *et al.*, 1997), e *Volvariella volvacea* (Lin; Chou, 1984). A lectina de *B. edulis* manifesta uma potente atividade mitogênica frente a esplenócitos de camundongos e atividade inibitória frente à transcriptase reversa HIV-1 (Zheng *et al.*, 2007), sendo vistas também estas atividades nas lectinas dos cogumelos *Armillaria luteo-virens* (Feng *et al.*, 2006), *Pleurotus citrinopileatus* (Li, *et al.*, 2008).

Ganoderma lucidum é um cogumelo medicinal bem conhecido, e muitos efeitos terapêuticos têm sido atribuídos a esse fungo. Uma lectina de 18 kDa foi isolada do seu micélio e outra foi purificada do corpo de frutificação (Kawagishi *et al.*, 1997). Possuindo o mesmo gênero, a espécie *Ganoderma capense* tem uma lectina que apresentou uma surpreendente termoestabilidade, manteve uma atividade hemaglutinante constante em uma ampla faixa de pH, uma potente atividade mitogênica frente a esplenócitos e atividade antiproliferativa em células tumorais (Patrick; Ngai; Ng, 2003).

Recentes avanços na tecnologia química têm permitido o isolamento e a purificação desses compostos, pertencentes aos Basidiomicetos superiores (cogumelos), que possuem forte imunomodulação e atividades antitumorais. O potencial farmacológico de tais compostos continua sendo o objetivo principal da maioria das pesquisas, incluindo isolamento, determinação da estrutura química e experimentos *in vitro* e *in vivo* (Smith; Rowan; Sullivan, 2002).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Purificar e caracterizar uma lectina do fungo *Clavaria cristata* (CcL), avaliar sua indução na ativação de macrófagos *in vitro*, verificar seu efeito antiproliferativo sobre linhagens de células tumorais e determinar seu potencial pró-inflamatório.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a lectina isolada (CcL) quanto à (ao):
 - Massa molecular;
 - Presença de subunidades;
 - Especificidade de ligação com diferentes tipos sanguíneos, carboidratos e glicoproteínas;
 - Efeito do pH sobre sua atividade hemaglutinante;
 - Efeito da temperatura sobre sua atividade hemaglutinante;
 - Dependência por íons bivalentes;
- Avaliar a atividade da CcL na indução da ativação de macrófagos *in vitro* e verificar a produção de óxido nítrico por macrófagos através de uma cinética de tempo;
- Avaliar o potencial pró-inflamatório da CcL por meio de modelo de edema de pata em camundongos.
- Avaliar o efeito antiproliferativo da CcL sobre linhagens de células tumorais;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Fungos

As amostras do fungo da espécie *Clavaria cristata* foram coletados no Parque Estadual Dunas (05°46'S - 35°12'O), localizado em Natal, Estado do Rio Grande do Norte, durante os períodos chuvosos de junho/ 2009 a agosto/2009. Os fungos foram, em seguida, transportados para o laboratório de Química e Função de Proteínas Bioativas, no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, no qual foram armazenados a -20 °C. A identificação da espécie coletada foi realizada pelo Professor Dr. Iuri Goulart Baseia, do Departamento de Botânica e Zoologia da mesma Universidade.

Classificação Taxonômica

Filo: Basidiomycota

Classe: Agaricomycetes

Ordem: Agaricales

Família: Clavariaceae

Gênero: *Clavaria*

Espécie: *Clavaria cristata*



Figura 2: Fungo *Clavaria cristata*. Fonte: www.calphotos.berkeley.edu

Camundongos Swiss

Os animais foram mantidos em Biotério localizado no Centro de Biociências pertencente ao departamento de Bioquímica da UFRN até atingirem peso entre 25 a 35 g. Estes foram mantidos com acesso livre a alimento e água, em temperatura ambiente e ciclo de 12/12 horas de claro e escuro. O presente trabalho foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte e aprovado sob o protocolo No. 011/2010.

Eritrócitos humanos

Os eritrócitos humanos foram obtidos através de doações de bolsas de sangue pelo HEMOCENTRO – RN. As bolsas fornecidas encontravam-se fora do prazo de validade para transfusões.

3.1.2. REAGENTES

- Papaína (Sigma-Co);
- Tripsina (Sigma-Co);
- Concanavalina A (Sigma-Co)
- Albumina sérica bovina – BSA (Sigma-Co)
- Kit de ensaio colorimétrico Nitrato/nitrito (Cayman Chemicals)
- Kit de quantificação de proteínas por BCA (Sigma-Co)
- Carboidratos: D-glucose, D-galactose, D-frutose, L-fucose, D-manose, D-arabinose, D-xilose, N-aceti-D-glucosamina, D-glucosamina, D-galactosamina, D-ribose, rafinose, L-rhamnose, ácido glucurônico, ácido galacturônico, metil- α -D-manopiranosídeos; D-melibiose, D-lactose e sacarose. Todos estes reagentes foram obtidos da Sigma-Co.
- Mucina submaxilar bovina - BSM(Sigma-Co)
- Mucina submaxilar suína - PSM (Sigma-Co)
- Fibrinogênio (Sigma-Co)

- Holo-transferrina (Sigma-Co)
- Tireoglobulina (Sigma-Co)
- LPS (Lipopolissacarídeos de *E. coli* (Sigma-Co)
- Carragenana (Sigma-Co)
- Acrilamida e N'N'-metilenobisacrilamida (Sigma-Co).
- TEMED – N, N, N',N'-tetrametiletilinodiamino – (Sigma-Co);
- Padrões de massas moleculares para eletroforese (Fermantas life sciences);
- Coomassie Blue G-250 e R-250 (Sigma-Co);
- Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

3.1.3. EQUIPAMENTOS

- Sistema de cromatografia líquida AKTA purifier (GE);
- Espectrofotômetro HITACHI U-2000;
- Agitador magnético TECNAL TE-081
- Banho-Maria (Tecnal - Te 056);
- Balança analítica eletrônica – SCIENTECH AS 210;
- Micro centrífuga eppendorf 5410;
- Concentrador 5301 Eppendorff
- pHmetro PHTEK
- Centrífuga HITACHI CR 21;
- Bomba Pump-1 Amersham Biosciences
- Coletor de frações REDIFRAC modelo 2112 da LKB (Bromma, Suécia).
- Microscópio biológico molecular E-100 (Nikon)
- Liofilizador Tecnal L108
- Purificador de água Milli-Q® Water System da Millipore Corp. (Bedford,MA, USA);

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Extração protéica do fungo *Clavaria cristata*

Os fungos foram limpos com água corrente, liofilizados e triturados em um liquidificador para obtenção de um pó de granulação fina. As proteínas solúveis totais dessa farinha foram extraídas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5, na proporção 1:10 (p/v). O extrato protéico foi submetido à agitação constante, em temperatura ambiente, por 2 h. Após tal procedimento, o material foi centrifugado a 12.000 x g por 30 min a 4 °C, para separar o precipitado da fração solúvel que foi designada de extrato bruto.

3.2.2. Dosagem protéica

A determinação da concentração de proteínas das amostras foi realizada pelo método do ácido bicinonínico BCA, (Smith *et al.*, 1985), utilizando um kit de quantificação por BCA (SIGMA), conforme instruções do fabricante, e albumina sérica bovina como padrão.

3.2.3 Preparação de eritrócitos para ensaios de hemaglutinação

- Lavagem dos eritrócitos para ensaios de hemaglutinação

Alíquotas de 2 mL de sangue foram lavadas com 12 mL de solução salina fisiológica e centrifugadas a 924 x g, até a obtenção de uma massa de eritrócitos íntegros livre de soro e material hemolisado.

- Tratamento dos eritrócitos com papaína

Uma solução estoque de papaína de 1 mg/mL em solução salina foi adicionada ao sangue, previamente lavado, na proporção de 1:1 (v/v). A mistura foi incubada por 30 minutos a 37 °C, com leve agitação ocasional. Em seguida, foi centrifugada a 924 x g, por 5 minutos e seu precipitado foi lavado 6 vezes com solução salina. Em seguida uma suspensão de eritrócitos na concentração de 4% foi preparada.

- Tratamento dos eritrócitos com tripsina

Uma solução estoque de tripsina na concentração de 1 mg/mL foi preparada e adicionada a 1 mL de sangue, previamente lavado. A mistura foi deixada em repouso por 1 hora, à temperatura ambiente, com leve agitação ocasional. Em seguida, foi centrifugada a 924 x g, por 5 minutos e seu precipitado lavado por 6 vezes com solução salina. Realizou-se o hematócrito e uma suspensão de eritrócitos diluída a 4% em solução salina foi preparada.

3.2.4. Detecção da atividade hemaglutinante

Com a finalidade de verificar a atividade hemaglutinante no extrato total e frações protéicas oriundos do fungo, testes de hemaglutinação foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Debray *et al.* (1981) por meio de diluição seriada das amostras (1/2, 1/4, 1/8, 1/16...) em placas de ELISA com fundo em "V", tanto na presença como na ausência dos íons metálicos: Ca^{+2} e Mg^{+2} (200 mM). No primeiro poço foram adicionados 25 μL do extrato total de *Clavaria cristata* e 25 μL de uma suspensão de eritrócitos a 4% tratados enzimaticamente enquanto que, a partir do segundo em diante foram adicionados 25 μL de solução salina contendo ou não íons, 25 μL da amostra diluída seriadamente e 25 μL de uma suspensão de eritrócitos a 4%, tratados com papaína e/ou tripsina. A reação foi incubada por 30 min, à temperatura ambiente. A aglutinação foi observada visualmente e o título expresso em unidades de hemaglutinação (UH), que foi definido como o inverso da maior diluição da amostra que tenha apresentado nítida aglutinação (Moreira *et al.*, 1997).

3.2.5 Cromatografia de exclusão molecular Sephacryl S200

Para o isolamento da lectina, presente no extrato bruto do fungo *C. cristata*, foram aplicados 33 mg de proteínas do extrato bruto em uma coluna de gel filtração Sephacryl S200 previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 com um fluxo de 0,4 mL/min. Frações de 1,2 mL das amostras foram coletadas e a absorbância medida a 280 nm. Ensaios de hemaglutinação foram realizados para a identificação do pico de atividade lectínica.

3.2.6. Cromatografia de troca iônica em Resource Q em sistema de FPLC-AKTA

Para purificar a lectina isolada na etapa anterior, 1 mL (1,4 mg) do pico com atividade hemaglutinante foi submetido à cromatografia de troca iônica Resource Q, em sistema de FPLC-AKTA em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0. Frações de 0,5 mL foram coletadas sob fluxo de 2 mL/min e as absorbâncias medidas a 280 e 215 nm. As frações que apresentaram atividade hemaglutinante foram reunidas e denominadas CcL.

3.2.7. Determinação da massa molecular por cromatografia de exclusão molecular em superose 6 10 300 GL em sistema de FPLC-AKTA

Para confirmação da purificação e determinação da massa molecular de CcL em condições nativas, 1mL (260 µg) de solução da proteína foi submetido à cromatografia de exclusão molecular em Superose 6 10 300 GL, acoplada ao sistema de FPLC-AKTA em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Esta coluna foi previamente calibrada com o seguinte padrão de proteínas: tireoglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), aldolase (158 kDa), Conalbumina (75 kDa). Frações de 0,5 mL foram coletadas sob fluxo de 0,5 mL/min e as absorbâncias medidas a 280 e 215 nm. A massa molecular aparente da lectina foi estimada a partir da interpolação logarítmica entre massas moleculares dos diferentes marcadores protéicos utilizados e os seus respectivos volumes de eluição.

3.2.8. Determinação da curva de dependência do íon cálcio

Objetivando-se determinar a curva de dependência de Ca^{+2} , alíquotas da lectina foram diluídas em soluções salinas contendo o íon Ca^{+2} nas seguintes concentrações: 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78 mM. A atividade da proteína foi visualizada e quantificada através do ensaio de hemaglutinação, descrito anteriormente.

3.2.9. Efeito da temperatura sobre a atividade da lectina

O efeito da temperatura sobre a atividade da lectina foi investigado, usando alíquotas da solução de lectina em Tris HCl 50 mM pH 7,5, as quais foram incubadas as temperaturas de 4, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 °C por uma hora. Após esse período sua atividade foi analisada pelo ensaio de hemaglutinação, à temperatura ambiente.

3.2.10. Efeito do pH sobre a atividade da lectina

Alíquotas da lectina foram dialisadas a 4°C por 24 horas contra tampões com pH variando entre 2,5 e 11,5 com a realização de 3 trocas para cada tampão. Os tampões utilizados foram Glicina-HCl 50 mM (pH 2,5 e 3,5), Acetato de sódio 50 mM (pH 4,5 e 5,5), Tris-HCl 50 mM (pH 7,5, 8,5 e 9,5) e Glicina-NaOH 50 mM (pH 10,5 e 11,5). Após esse tratamento, uma nova diálise foi realizada contra tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, a 4 °C por 24 horas. Ensaio de hemaglutinação foram realizados em seguida.

3.2.11. Especificidade da lectina purificada a carboidratos e glicoproteínas

Os ensaios de hemaglutinação para determinação da especificidade da CcL foram realizados da mesma forma que descrito no item 3.2.4. No entanto, após a diluição seriada da amostra, 25 µL das glicoproteínas e carboidratos, nas

concentrações de 2,0 mg/mL e 200 mM, respectivamente, foram adicionados. A mistura foi deixada em contato por 1 hora, antes da adição dos eritrócitos. Os inibidores testados foram os monossacarídeos: D-glucose, D-galactose, D-frutose, L-fucose, D-manose, D-arabinose, D-xilose, N-acetil-D-glucosamina, D-glucosamina, D-galactosamina, D-ribose, rafinose, L-rhamnose, ácido glucurônico, ácido galacturônico, metil- α -D-manopiranosídeos; os dissacarídeos D-melibiose, D-lactose e sacarose; os polissacarídeos fucoidan, inulina, condroitin sulfato A e condroitin sulfato C; e as glicoproteínas mucina bovina (BSM), asialo-BSM, mucina suína (PSM), asialo-PSM, fetuína, asialofetuína, fibrinogênio, asialofibrinogênio, holo-tranferrina e tireoglobulina.

3.2.12. Determinação da menor concentração inibitória da glicoproteína

Para a determinação da menor concentração de mucina capaz de inibir a atividade hemaglutinante da lectina, a glicoproteína BSM, na concentração inicial de 2 mg/mL, foi submetido à diluição seriada em solução de NaCl 150 mM, de forma semelhante ao descrito anteriormente. Vinte e cinco microlitros da amostra foram adicionados e deixados em contato por 1 hora, antes da adição dos eritrócitos. A menor concentração de mucina capaz de inibir a hemaglutinação da preparação de lectina foi calculada.

3.2.13. Eletroforese em gel de poliacrilamida descontínuo e desnaturante (SDS-PAGE)

Com o intuito de avaliar o grau de pureza das amostras protéicas, as mesmas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% em presença de SDS, de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). O gel de separação foi preparado com 1,25 mL de acrilamida-bisacrilamida 30%; 1,25 mL de tampão Tris-HCl 1,5M pH 8,8; 2,425 mL de água destilada; 50 μ L de SDS 10%; 5 μ L de TEMED concentrado e 25 μ L de persulfato de amônio 30%. O gel de concentração continha 0,33 mL de acrilamida-bisacrilamida 30%; 625 μ L de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8;

1,5 mL de água destilada; 25 µL de SDS 10%; 5 µL de TEMED e 12,5 µL de persulfato de amônio. O tampão de corrida consistia de Tris 25 mM; glicina 192 mM e SDS 10%. Uma vez diluída em tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M, SDS 2%, glicerol 10% v/v, 0,01% de azul de bromofenol), num volume de 20 µL, a alíquota foi aplicada no gel (10 x 14 cm, com espaçadores de 0,75 mm), sendo foi submetido a corrente constante de 30 mA por, aproximadamente, 2 horas. O gel foi corado em solução de *Coomassie Blue* R 250 a 1%, etanol 40% e ácido acético 10% em água. As bandas protéicas foram descoradas após a imersão do gel em uma solução descorante (etanol 30% e ácido acético 10%). Para determinar a massa molecular da proteína isolada, foram utilizados marcadores padrões de proteínas.

3.2.14 Eletroforese em gel de poliacrilamida descontínuo e não desnaturante (PAGE)

A metodologia estabelecida por Laemmli (1970) foi modificada para a análise de CcL. O protocolo do item 3.2.13 foi repetido, sem a adição de SDS. A eletroforese foi realizada sob corrente constante de 20 mA por, aproximadamente, 2 horas até que o marcador de corrida (azul de bromofenol) atingisse o final do gel.

3.2.15. Preparo da cultura de macrófagos para avaliação da indução e produção de óxido nítrico pela lectina

A metodologia estabelecida por Oliveira *et al* (2006) foi modificada para o preparo da cultura de macrófagos e avaliação da indução e produção de óxido nítrico pela lectina. Macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos por lavagem com 4 mL de tampão fosfato a 4°C. Posteriormente, o lavado peritoneal foi centrifugado a 924 x g, 4°C, por 3 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado homogeneizado com 8 mL de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37°C. Em seguida, as células foram contadas usando a câmara de Neubauer. Os macrófagos ($2,0 \times 10^5$ células/poço/100µL em meio DMEM suplementado com 10% de

soro fetal bovino) foram distribuídos em uma placa estéril de 96 poços e incubados a 37°C sob uma atmosfera úmida de 5% de CO₂ por 30min. As células não – aderidas foram removidas por lavagem com meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, e então, este mesmo meio foi acrescentado à cultura, sendo novamente incubada por mais 3h a 37°C sob uma atmosfera úmida de 5% de CO₂. Após o tempo de 3h, foi realizada mais uma lavagem para a retirada do meio suplementado com soro e adicionar o meio DMEM sem soro fetal bovino e em seguida a placa foi incubada com a lectina por 24h e posteriormente foi realizada uma cinética de tempo para verificar a produção de óxido nítrico nos tempos de 12h, 18h, 24h, 36h, 48h e 72h.

Para a avaliação da produção de óxido nítrico no tempo de 24h, a lectina foi inicialmente adicionada à cultura nas concentrações de 10, 25, 50 e 100µg/mL. Um controle foi realizado pré-incubando a lectina com a glicoproteína BSM por 30 min a 37°C, antes da adição desta mistura no ensaio. A albumina também foi adicionada a cultura na concentração de 100µg/mL. O lipopolissacarídeo (LPS) foi utilizado como controle positivo na concentração de 10µg/mL, visto que ele é um dos mais bem estudados lipopolissacarídeos da parede celular bacteriana com forte atividade imunomodulatória para indução da produção de óxido nítrico, e o controle negativo sendo apenas a cultura de macrófago sem a adição de nenhum outro composto. Para a realização da cinética de tempo, a CcL (100µg/mL), CcL (100µg/mL) + glicoproteína BSM, ConA (10µg/mL), LPS (10µg/mL), Dexametasona (5mM), albumina (100µg/mL) foram adicionadas a cultura de macrófagos nos tempos de 12h, 18h, 24h, 36h, 48h e 72h. Os experimentos foram executados em triplicata.

3.2.16. Ensaio para a medição dos níveis de nitrato/nitrito

Os níveis de nitrato/nitrito são utilizados como uma medida indireta para verificar a produção de óxido nítrico produzido pelos macrófagos visto que o óxido nítrico tem um tempo de meia vida curto e sofre oxidação espontânea para esses metabólitos inativos.

A produção de óxido nítrico foi estimada medindo a concentração de nitrato (com ou sem nitrito) presentes no sobrenadante da cultura de macrófagos utilizando

um kit de ensaio colorimétrico para nitrito/nitrato (Cayman chemical). Os ensaios foram realizados acrescentando-se 80µl do sobrenadante do meio de cultura de macrófagos nos poços de uma placa de ELISA. Em seguida, 10 µl do cofator de enzima foram adicionados nos testes e logo depois foram adicionados 10 µl da enzima redutase nitrato. As amostras ficaram incubadas por 2h a temperatura ambiente, e após esse período foram adicionados 50µl do reagente de Griess R1 a cada um dos poços e imediatamente acrescentou-se 50µl do reagente de Griess R2. A reação processou-se por mais 10 min, a temperatura ambiente e então a absorbância foi medida utilizando um espectrofotômetro (leitor de microplaca) com um filtro de 540nm.

Os resultados foram expresso em µM de NO₃, baseado em uma curva padrão de NaNO₃ dissolvida em meio de cultura.

3.2.17. Cultura de células

As linhagens de células 3T3 (fibroblastos) e HepG2 (hepatoma) foram cultivadas em meio DMEM , enquanto que MDA – 435 (câncer de mama) foram cultivadas em RPMI 1640 ambos suplementados com 10% de SFB, 100 U/mL de penicilina, e 100 µg/mL de estreptomicina a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂. As células HepG2 e 3T3 foram semeadas (3 x 10³ células/mL) e MDA (2 x 10⁴ células/mL) em microplacas de cultivo de 96 poços e incubadas por um período de 72 horas com concentrações de CcL que variaram de (0,5 a 50 µg/mL).

3.2.18. Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada pelo teste de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) de acordo com a metodologia utilizada por Yan *et al* (2009) com modificações. O teste do MTT avalia a integridade mitocondrial das células testadas baseado na redução enzimática do corante até o produto chamado formazan pelas desidrogenases mitocondriais. Após o período de tratamento de 72 horas com as diferentes concentrações de CcL, as células foram incubadas em

meio de cultura contendo 1 mg/mL de MTT por 4 horas e posteriormente lavadas com etanol por cinco minutos para solubilização do formazan. A absorbância das amostras foi monitorada a 570 nm.

3.2.19. Avaliação da ação da CcL sobre o edema de pata em camundongos

O modelo experimental de edema de pata em camundongos, induzido pela CcL, foi utilizado para testar a capacidade dessa lectina em produzir um processo inflamatório agudo segundo a metodologia descrita por Queiroz *et al* (2008). Os animais foram separados em grupos de seis camundongos. Cada animal recebeu na superfície plantar da pata traseira direita 1, 5, 10 ou 50 µg de CcL dissolvida em 50 µL de solução estéril de NaCl a 0,15M, como controle foram injetados 50 µL de solução estéril de NaCl a 0,15M na superfície plantar da pata traseira esquerda. A carragenana 1% dissolvida em 50 µL de solução estéril de NaCl a 0,15M foi injetada na pata traseira direita no grupo controle positivo. Após o período de 4h, os animais foram sacrificados e as patas foram amputadas no nível da junta tarso-crural e a massa das patas foi mensurada em balança analítica digital. A diferença de massa entre as patas direita e esquerda indicava o grau de inflamação. A média do aumento do volume das patas para cada grupo foi calculada.

3.2.20. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± SD e analisados por ANOVA. A diferença entre os grupos foi realizada pelo teste de Tukey-Kramer. O valor de $p < 0,001$ é considerado extremamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1. Detecção da atividade hemaglutinante no extrato bruto do fungo *Clavaria cristata*

Para detectar a presença de lectinas nos extratos bruto de *C. cristata* foram realizados ensaios de hemaglutinação com eritrócitos humanos nativos, sem a presença de íons e os resultados estão apresentados na tabela 1. Nestas condições a maior atividade específica foi detectada para sangue do tipo O. Posteriormente a atividade hemaglutinante também foi testada com eritrócitos humanos submetidos a tratamentos enzimáticos com papaína e tripsina, na presença de íons cálcio e magnésio, e os resultados estão demonstrados na tabela 2. Os eritrócitos tratados com tripsina foram os que apresentarem uma maior sensibilidade à aglutinação. Dentre os íons testados, os íons cálcio e manganês demonstraram ser os melhores ativadores da atividade lectínica, especialmente para os eritrócitos do tipo O. Dessa forma, o sangue tipo O tratado enzimaticamente com tripsina e íon cálcio passaram a ser utilizados nos ensaios posteriores de hemaglutinação.

Tabela1: Atividade Hemaglutinante do Extrato Bruto do Fungo

TIPO SANGUÍNEO	EXTRATO BRUTO FUNGO <i>C. cristata</i> (U.H*/mg)**
A	1,07
B	0,13
O	2,14

*Unidade de Hemaglutinação (UH): definida como o inverso da maior diluição da amostra que apresentou nítida aglutinação.

**Atividade específica: unidades de hemaglutinação por miligrama de proteína. (UH/mg).

Tabela2: Atividade Hemaglutinante do Extrato Bruto do fungo *Clavaria cristata* na presença de íons bivalentes

ÍON	TIPO SANGUÍNEO	TÍTULO DE HEMAGLUTINAÇÃO (U.H*./mg**)		
		NATIVOS	TRATADOS	
			PAPAÍNA	TRIPSINA
CÁLCIO	A	17,14	0,53	17,14
	B	8,57	0,27	8,57
	O	4,28	0,53	34,28
MAGNÉSIO	A	8,57	0,53	8,57
	B	4,28	0,27	1,07
	O	4,28	0,53	17,14

* Unidade de Hemaglutinação: definida como o inverso da maior diluição da amostra que apresentou nítida aglutinação.

** Atividade específica: unidades de hemaglutinação por miligrama de proteína.

4.2. Determinação da especificidade da lectina presente no extrato bruto do fungo

A atividade hemaglutinante foi reduzida pelas glicoproteínas BSM, asialo-BSM, PSM, asialo-PSM, fetuína, asialofetuína, fibrinogênio e asialofibrinogênio. Com destaque para as glicoproteínas BSM, asialo-BSM, mucina e asialofetuína em que se obteve 100% de inibição (Figura 3). Os demais açúcares e glicoconjugados apresentaram pouco ou nenhum efeito sobre a atividade lectínica do extrato bruto do fungo.

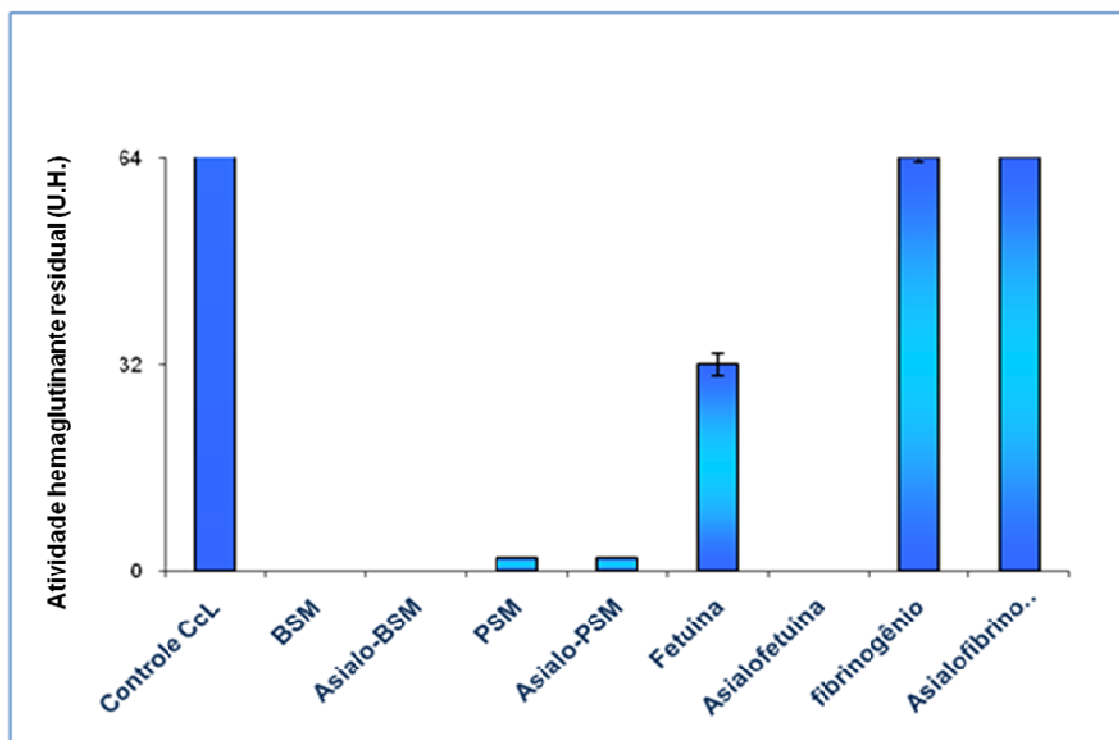


Figura 3: Inibição da atividade hemaglutinante do extrato bruto do fungo. Após diluição seriada da amostra foram adicionados 25 μL do inibidor teste, na concentração de 200 mM ou 2mg/mL, e deixados em contato por 1 hora, antes da adição dos eritrócitos do tipo O trisinizados na presença de íons cálcio. Os resultados foram representados como média \pm DP da triplicata.

4.3. Purificação da lectina em cromatografia de exclusão molecular Sephacryl s-200

As proteínas do extrato bruto foram separadas em coluna de exclusão molecular Sephacryl S-200 e observou-se a presença de quatro frações protéicas. Em seguida, foi realizado um ensaio de hemaglutinação com a finalidade de detectar qual destas frações apresentava atividade hemaglutinante e verificou que das quatro frações protéicas somente uma fração apresentou atividade (Figura 4). Desta forma, o pico com atividade lectínica foi reunido para posteriores processos de purificação. Nesta etapa de purificação, a lectina apresentou um aumento de 14 vezes na sua atividade específica (Tabela 3).

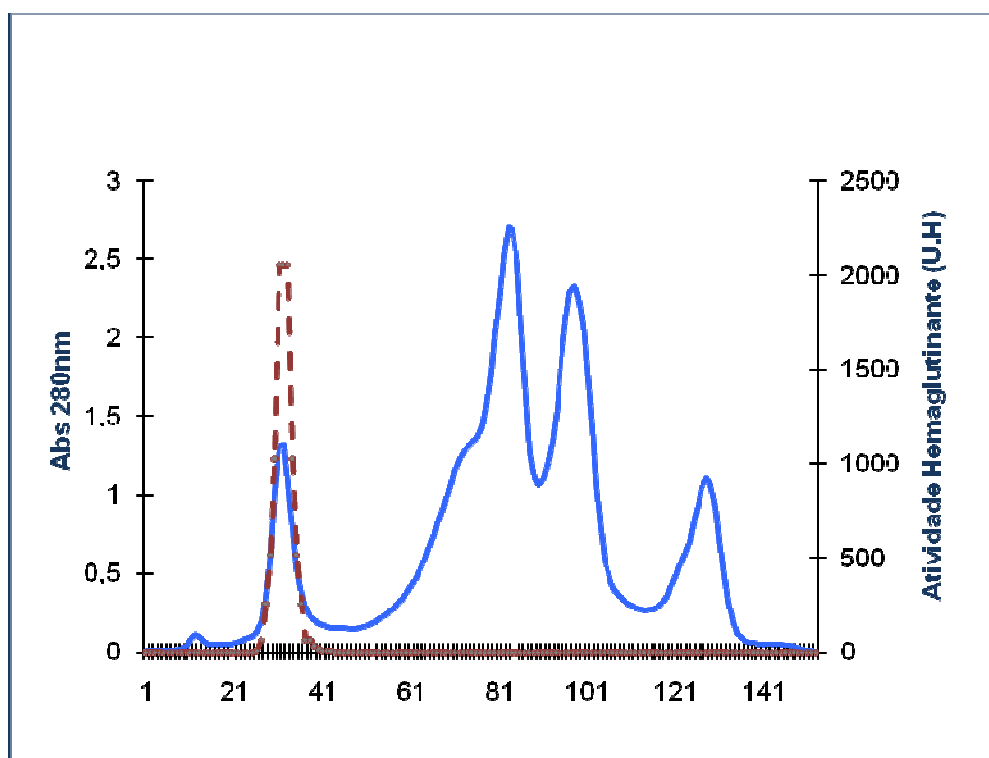


Figura 4: Perfil cromatográfico do extrato bruto do fungo *C. cristata*, em coluna de exclusão molecular S200. A coluna foi equilibrada e a amostra foi eluída com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, sob um fluxo de 0,4mL/min, monitorada a 280 nm. A atividade hemaglutinante foi detectada na presença de 4% de eritrócitos humanos do tipo O tratados com tripsina na presença de íons cálcio. A linha tracejada refere-se as frações as quais apresentam atividade hemaglutinante.

4.4. Purificação da lectina por cromatografia de troca iônica, Resource Q em sistema de FPLC-AKTA

A fração lectínica enriquecida em atividade hemaglutinante separada por exclusão molecular em coluna de Sephacryl S-200 foi aplicada numa coluna de troca aniônica Resource Q em sistema de FPLC-AKTA e as frações com atividade hemaglutinante, foram reunidas para efetuar a caracterização da proteína (figura 5). A lectina apresentou atividade específica de aproximadamente 3938 UH/mg e essa atividade foi aumentada 115 vezes, conforme mostra a tabela de purificação (Tabela 3). A lectina purificada nesta etapa foi denominada CcL (Lectina de *Clavaria cristata*).

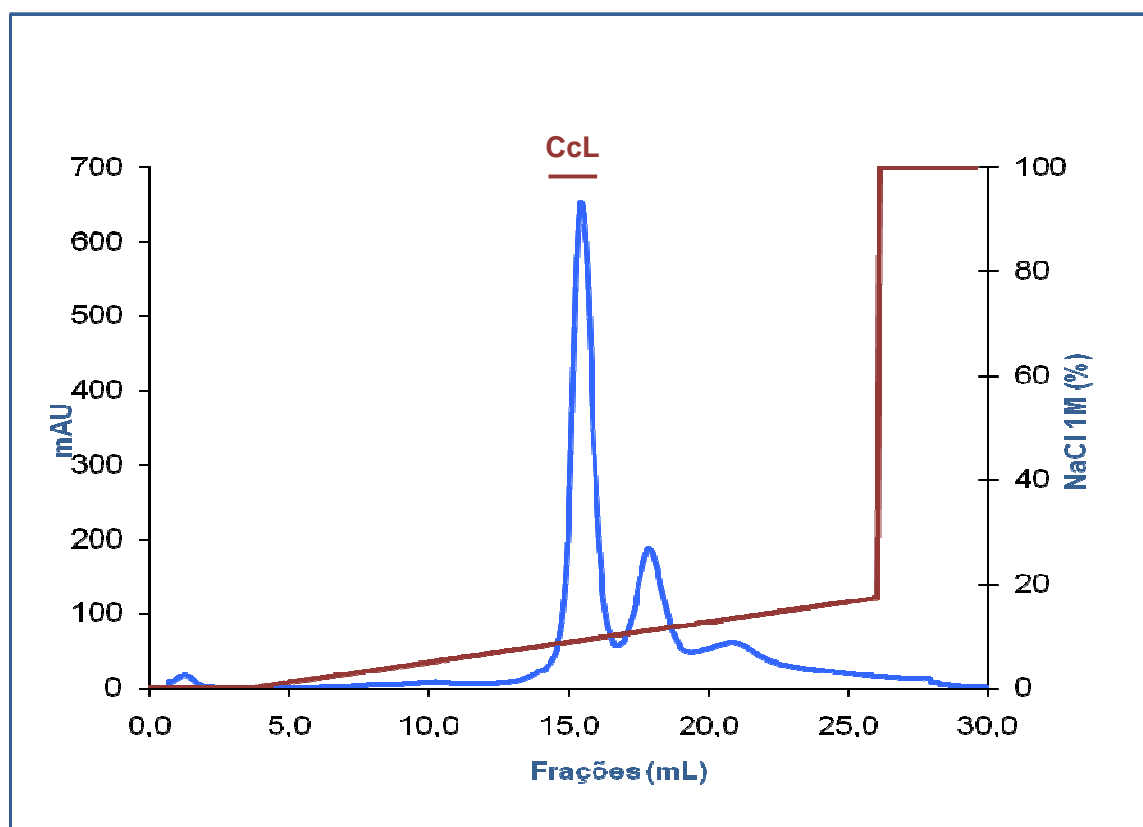


Figura 5: Perfil Cromatográfico de CcL na coluna de troca iônica Resource Q em sistema de FPLC-AKTA. A coluna foi previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 (Tampão A) e a amostra foi eluída da coluna com tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 contendo 1M de NaCl (Tampão B) sob um fluxo de 2 mL/min. As frações (0,5 mL/tubo) foram monitoradas a 280 e 215 nm. A atividade hemaglutinante (1024U.H) foi detectada na presença de 4% de eritrócitos humanos do tipo O tratados com tripsina na presença de íons cálcio. A barra horizontal representa as frações com atividade hemaglutinante.

Tabela 3: Etapas de purificação da Lectina do Fungo *C.cristata*.

Fração	Volume Total (mL)	Proteína Total (mg)	Atividade Total (UH)	Atividade específica (UH/mg)	Purificação (vezes)	Rendimento (%)
Extrato Bruto	10,0	119,48	4095,77	34,28	1	100
CcL Isolada Pós-S200	3,0	4,33	2047,65	472,97	14	3,6
CcL Purificada	1,0	0,26	1023,98	3938,46	115	0,2

4.5. Determinação da massa molecular da proteína nativa por cromatografia de exclusão molecular em Superose 6 10 300 GL em sistema FPLC-AKTA

Para confirmar a purificação e determinar a massa molecular de CcL, a proteína foi submetida à cromatografia de exclusão molecular Superose 6 10 300 GL, em sistema de FPLC-AKTA, previamente calibrada com proteínas de massas moleculares conhecidas (Figura 6A). Após determinação dos volumes de eluição das proteínas marcadoras e da proteína teste foi construída uma curva em escala semi-log (Figura 6B), e calculada a massa molecular da CcL, em sua forma nativa, apresentando uma massa molecular de aproximadamente 140 kDa.

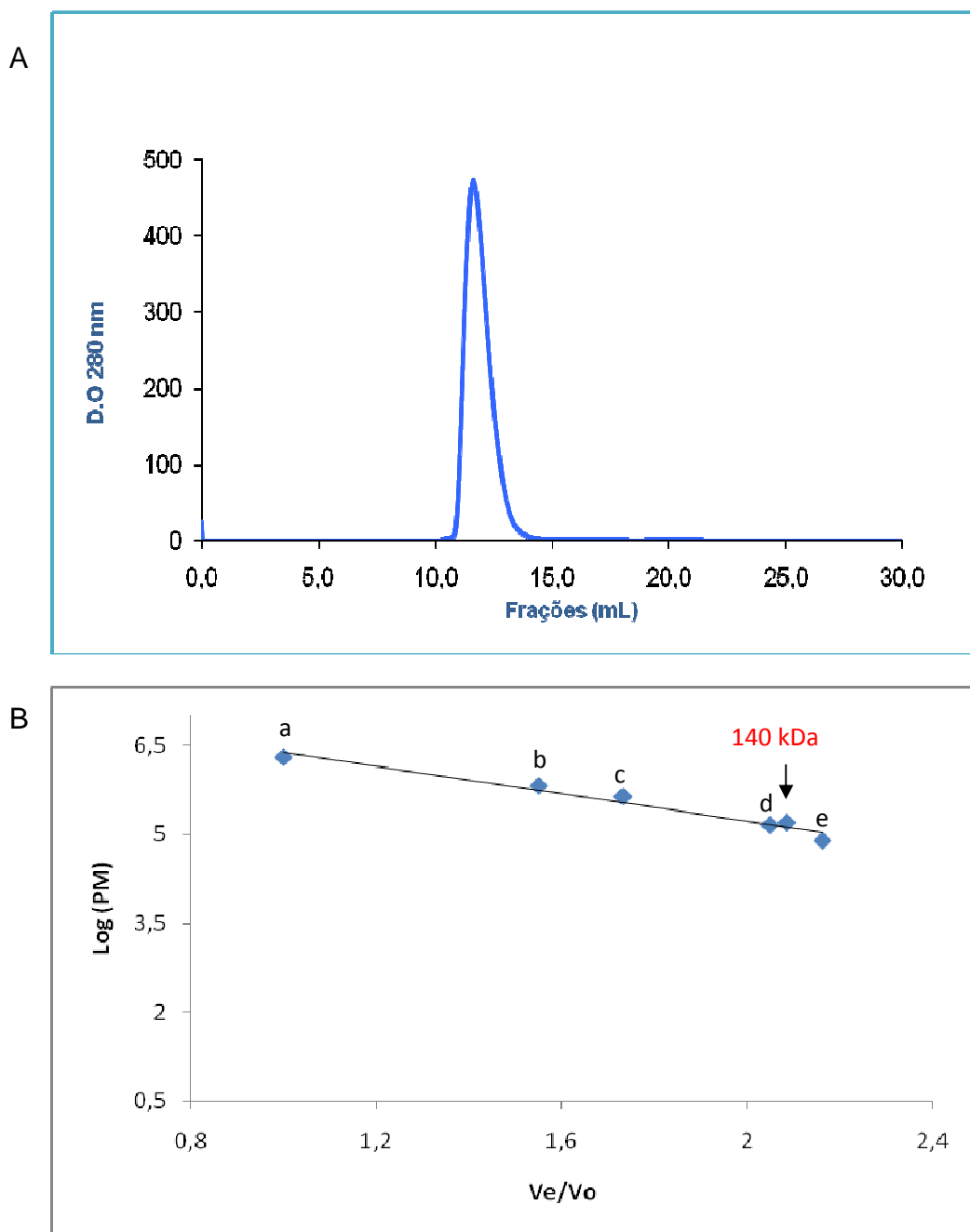


Figura 6: Perfil cromatográfico de CcL em coluna de exclusão molecular e determinação da massa molecular. (A) Perfil Cromatográfico de CcL na Coluna de Exclusão Molecular Superose 6 10 300 GL em sistema de FPLC-AKTA, em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5. As frações (0,5mL/tubo) foram monitoradas a 280 e 215nm. A atividade hemaglutinante foi detectada na presença de 4% de eritrócitos humanos do tipo O. (B) Determinação da massa molecular de CcL (140,3 kDa). Os marcadores de massa molecular padrão utilizados foram: (a) Blue Dextran (2000kDa), (b)Tireoglobulina (668kDa), (c) Ferritina (440kDa), (d) Aldolase (158 kDa), (e) Conalbumina (75kDa), Log Mr – logaritmo da massa molecular, V_e/V_0 – relação entre o volume de eluição da proteína e o volume de vazio.

4.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida

As diversas etapas de purificação da lectina do fungo *C. cristata* foram analisadas por eletroforese em condições desnaturantes por SDS-PAGE (12%) e não-desnaturantes por PAGE (12%) (Figura 7A e B). A lectina analisada por SDS-PAGE em condições desnaturantes apresentou uma banda protéica homogênea com massa molecular de aproximadamente 66 kDa e quando submetida a aquecimento a 100 °C por 5 min apresentou uma única banda em torno de 14,5 kDa, calculada por regressão linear, tendo por base padrões protéicos de massas moleculares conhecidas. A mesma banda de 14,5 kDa foi verificada quando a amostra foi analisada em condições redutoras por β -mercaptoetanol (dados não mostrados). A banda protéica em torno de 14,5 kDa, provavelmente, se trata das subunidades desta proteína e a banda protéica em torno de 66 kDa se deve provavelmente a um complexo de subunidades. Uma única banda corada por *Comassie blue* foi observada no PAGE para a CcL, revelando que, de fato, a lectina foi purificada.

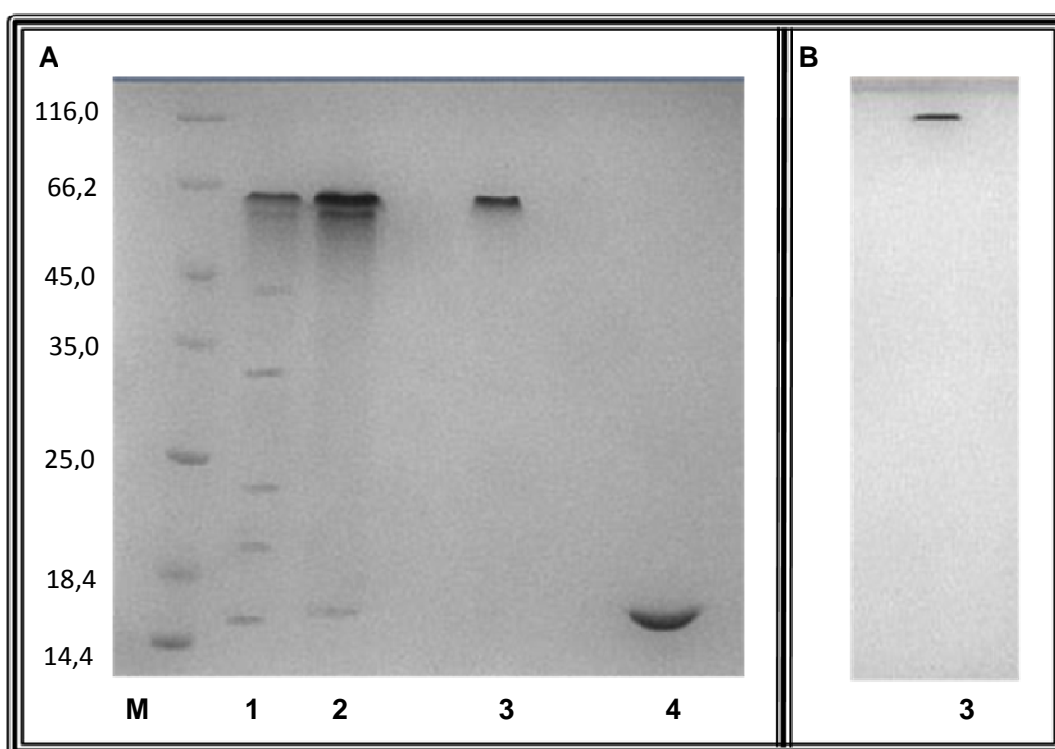


Figura 7: Eletroforese em gel de Poliacrilamida. (A) Desnaturante a 12% (SDS-PAGE) e (B) Não desnaturante a 12% (PAGE): Linha 1 – Extrato Bruto; Linha 2 – Material pós-coluna de gel filtração S-200; Linha 3 – CcL (sem tratamento térmico); Linha 4 – CcL (com tratamento térmico); M - Marcadores de massa molecular (kDa): β -galactosidase (116,0); Albumina Sérica Bovina (66,2); Ovalbumina (45,0); Lactato desidrogenase (35,0), Endonuclease de restrição BAP 981 (25,0); β -lactoglobulina (18,4) e Lisozima (14,4). As proteínas foram coradas com Comassie blue.

4.7. Determinação da massa molecular por SDS-PAGE

A massa molecular da CcL não-aquecida e aquecida foi determinada, analisando a sua mobilidade eletroforética com relação aos marcadores (Figura 8), correspondendo a 66 kDa e 14,2 kDa respectivamente.

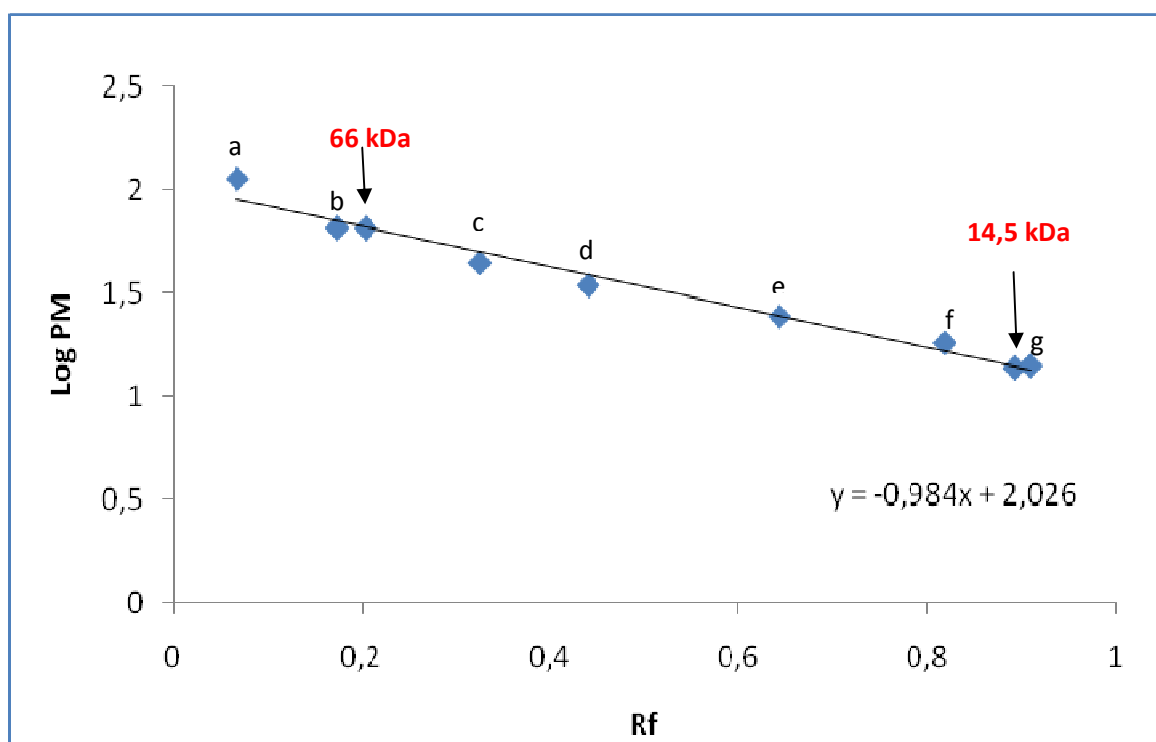


Figura 8: Determinação da massa molecular da CcL por SDS-PAGE através da curva de calibração dos padrões moleculares de proteínas, determinada por SDS-PAGE. Os marcadores de massa molecular padrão utilizados foram: (a) β -galactosidase (116,0); (b) Albumina Sérica Bovina (66,2); (c) Ovalbumina (45,0); (d) Lactato desidrogenase (35,0), (e) Endonuclease de restrição BAP 981 (25,0); (f) β -lactoglobulina (18,4) e (g) Lisozima (14,4). As proteínas foram coradas com Comassie blue.

4.8. Atividade hemaglutinante da CcL

A lectina do fungo *C. cristata* purificada foi submetida a ensaios de hemaglutinação, apresentando os resultados descritos na tabela 4. Apesar de demonstrar atividade hemaglutinante para todos os tipos de eritrócitos do sistema ABO, submetidos ou não a tratamentos enzimáticos, eritrócitos do tipo O demonstraram os mais elevados títulos de aglutinação, preferencialmente após tratamento com tripsina e na dependência de íons Ca^{2+} .

Tabela 4: Atividade hemaglutinante de CcL purificada.

ÍON	TIPO SANGUÍNEO	TÍTULO DE HEMAGLUTINAÇÃO (U.H*/.mg**)		
		NATIVOS	TRATADOS	
			PAPAÍNA	TRIPSINA
CÁLCIO	A	484,8	0	484,8
	B	484,8	0	484,8
	O	4,28	0	3938,4
MAGNÉSIO	A	484,8	0	484,8
	B	484,8	0	969,7
	O	4,28	0	484,8

*Unidade de Hemaglutinação (UH): definida como o inverso da maior diluição da amostra que apresentou nítida aglutinação.

**Atividade específica: unidades de hemaglutinação por miligrama de proteína. (UH/mg).

4.9. Curva de dependência da lectina por íon cálcio

A lectina isolada do fungo *C. cristata* apresentou atividade hemaglutinante dependente da presença do íon Ca^{+2} . Em virtude desse fato, uma curva de dependência do íon foi construída utilizando-se as concentrações de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56 mM (figura 9).

O experimento revelou que a máxima atividade hemaglutinante da lectina é alcançada na concentração de 50 mM de cálcio.

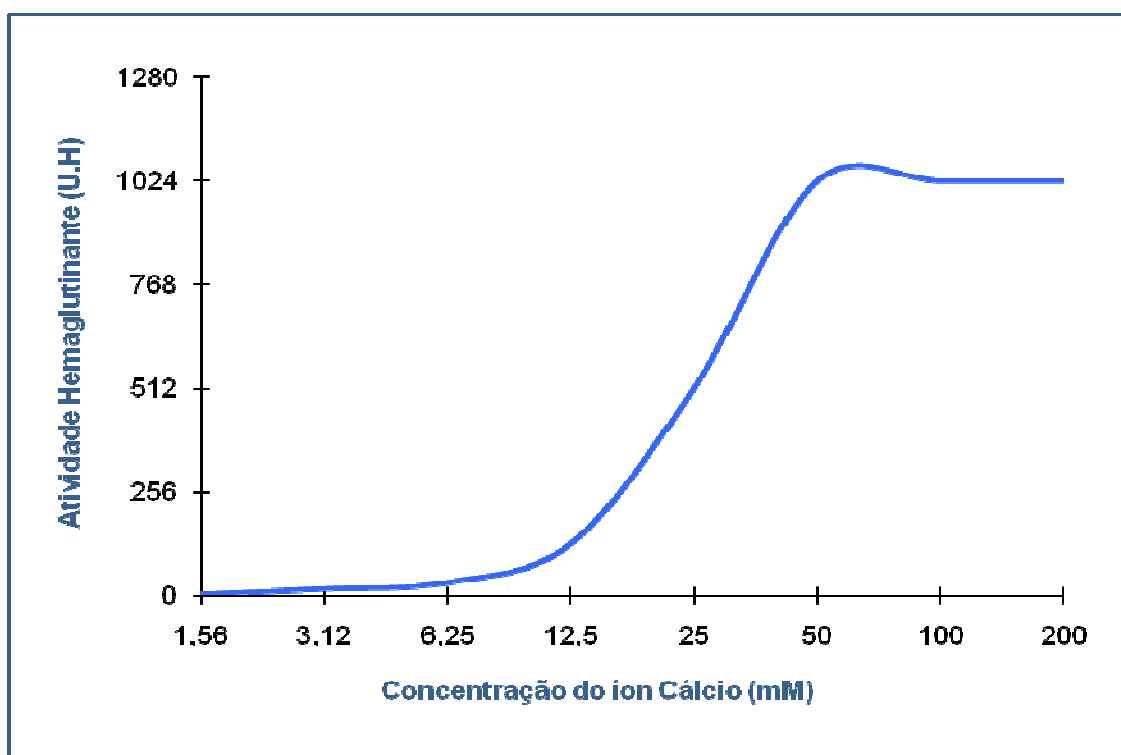


Figura 9: Curva de Dependência da Lectina por Íon cálcio. Ensaios de hemaglutinação com a lectina foram realizados utilizando-se as concentrações de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56 mM do íon cálcio.

4.10. Curva de termoestabilidade da CcL

CcL manteve sua atividade hemaglutinante até a temperatura máxima de 80°C, apresentando uma redução em 50% da sua atividade à temperatura de 90°C, e uma completa inibição da atividade hemaglutinante após 60 min a 100°C. (Figura 10).

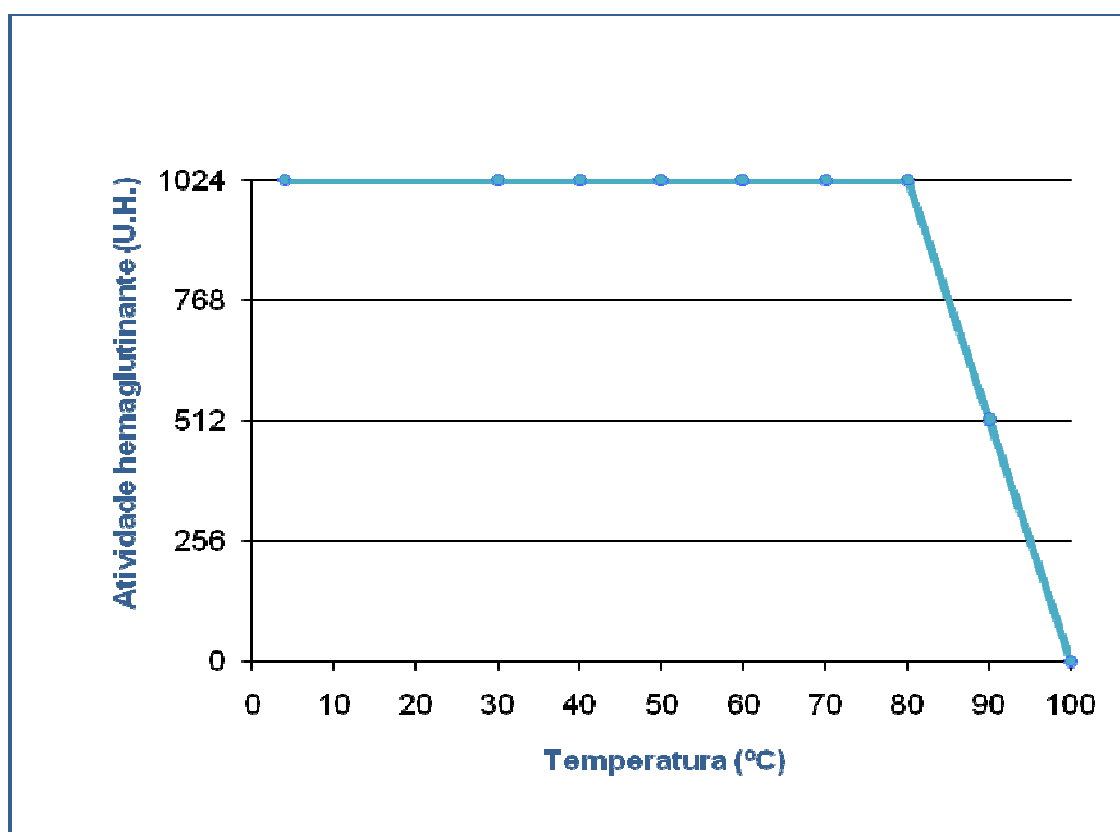


Figura 10: Curva de Termoestabilidade da CcL. A lectina foi submetida a temperaturas de 4, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100°C durante 1 hora. Após a incubação, ensaios de hemaglutinação com a lectina foram realizados à temperatura ambiente.

4.11. Curva de efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante da CcL

A figura 11 mostra o efeito do pH sobre a atividade hemaglutinante após diálise da lectina em diferentes tampões para diferentes faixas de pH seguido de retorno ao tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Observa-se uma atividade constante independentemente do valor de pH ao que a mesma foi submetida.

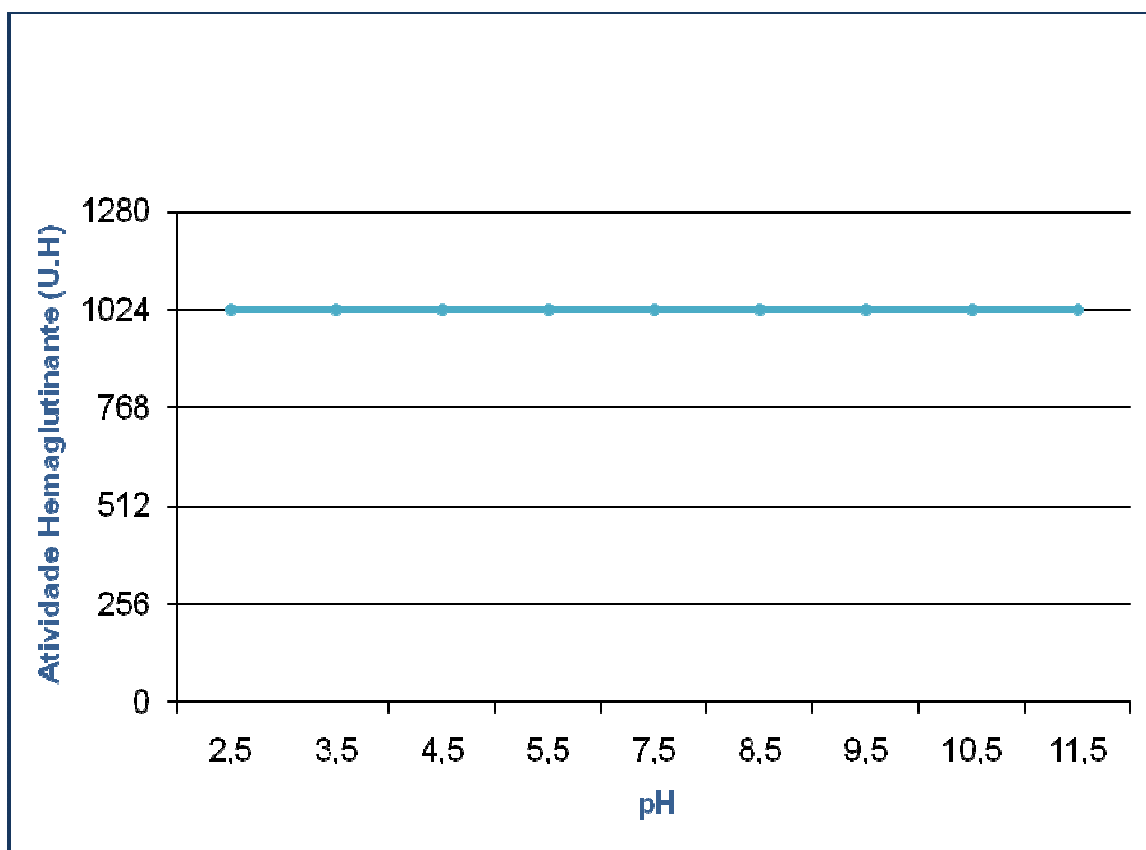


Figura 11: Efeito do pH sobre a lectina. A lectina isolada do fungo *C. cristata* foi submetida aos diferentes tampões: Glicina-HCl 50 mM pH 2,5 e 3,5; Acetato de sódio 50mM pH 4,5 e 5,5; Tris-HCl 50 mM pH 7,5; 8,5 e 9,5; Glicina-NaOH 50 mM pH 10,5 e 11,5. Seguida de uma nova diálise contra o tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 a 4°C durante 24 horas. Terminado esse tratamento ensaios de hemaglutinação foram realizados.

4.12. Inibição da atividade hemaglutinante da CcL por carboidratos e glicoproteínas

Utilizando os mesmos açúcares e gliconjugados empregados na inibição do extrato bruto, foi realizado o ensaio de inibição da atividade da lectina purificada. Foi possível observar que a CcL teve sua atividade hemaglutinante inibida completamente apenas com as glicoproteínas BSM, asialo-BSM e asialofetuína, o que indica sua especificidade para essas glicoproteínas. A menor concentração de BSM, asialo-BSM e asialofetuína capaz de inibir a sua atividade hemaglutinante foi de 0,125 , 1 e 1 µg/mL, respectivamente.

4.13. Avaliação dos níveis de nitrato/nitrito em cultura de macrófagos

Como algumas lectinas isoladas possuem habilidade de atuar como imunomoduladoras promovendo a ativação de macrófagos com consequente liberação de óxido nítrico foi realizado um teste para verificar se a CcL também apresentava esta capacidade.

Considerando os produtos finais mais estáveis do óxido nítrico *in vivo*, quanto maior a ativação de macrófagos, maiores serão os níveis de nitrito/nitrato presentes na cultura. Inicialmente, os experimentos foram realizados utilizando a lectina nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 µg/mL com o objetivo de verificar qual concentração resultaria em maior produção de óxido nítrico (Figura 12A). A partir dos dados obtidos na curva dose resposta (lectina/nitrito-nitrato), um segundo experimento foi realizado utilizando a lectina na concentração de 100 µg/mL (em que se obteve maior ativação do macrófago), na presença (e ausência) da glicoproteína BSM e também com um inibidor da óxido nítrico sintase, a dexametasona. Os resultados demonstrados na figura 12A indicaram que CcL na concentração de 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL obteve aumento significativo em relação ao controle negativo (**p<0,01, ***p<0,001 e ***P<0,001, respectivamente), enquanto que na concentração de 10 µg/mL não houve diferença estatística. Não houve diferença estatística entre a lectina ConA (10 µg/mL), uma lectina em que sua capacidade de ativar macrófagos com consequente liberação

de óxido nítrico já tem sido muito bem estabelecida, e CcL (Figura 12B). Nos ensaios nos quais a CcL (100 µg/mL) foi incubada com dexametasona houve uma diminuição estatisticamente significativa (**p<0,001) na produção de óxido nítrico, não havendo diferença estatística entre a lectina incubada com dexametasona e o controle negativo, indicando que essa liberação de óxido nítrico está relacionada com a atividade da enzima óxido nítrico sintase (Figura 12B).

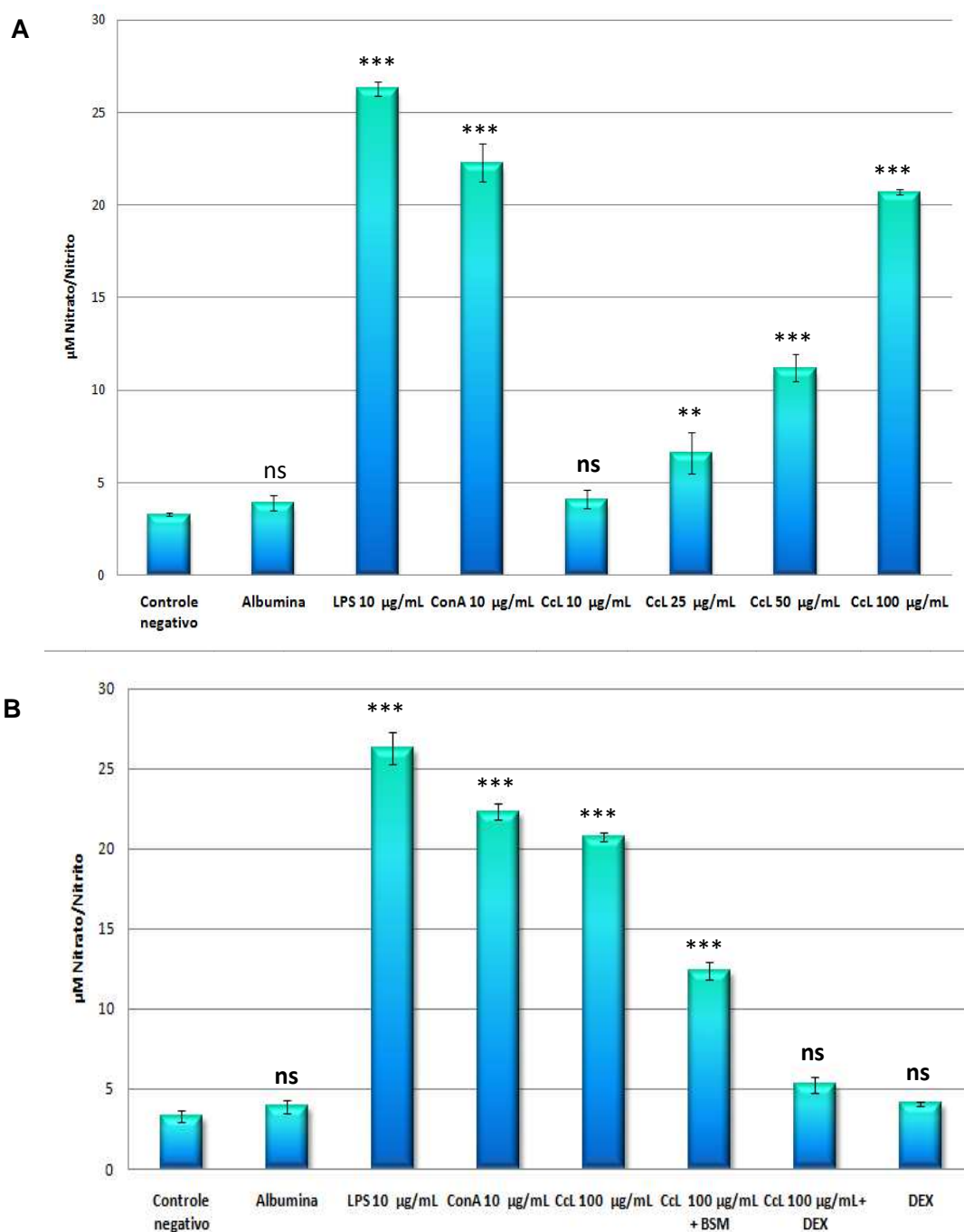


Figura 12: Produção de Óxido Nítrico. (A)*** $p < 0,001$ indica um aumento significativo entre o controle negativo e LPS e a CcL nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e ** $p < 0,01$ indica o aumento significativo entre o controle negativo e a CcL na concentração de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Não houve diferença significativa entre o controle negativo, albumina e a lectina na concentração de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (B) Houve um aumento significativo entre o controle negativo e a ConA (***) $p < 0,001$). Não houve diferença significativa entre o controle negativo, albumina, dexametasona e a lectina na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ incubada com dexametasona. Cada coluna representa os valores médios \pm DP, $n=3$.

Em decorrência do tratamento de macrófagos com concentrações diferentes de ConA e CcL resultar na produção de óxido nítrico, foi realizada uma cinética de tempo da produção de NO. A produção máxima foi observada com 10 $\mu\text{g/mL}$ de ConA e 100 $\mu\text{g/mL}$ de CcL no tempo de 24h. Foi observado um leve declínio na produção de óxido nítrico após o pico de 24h.

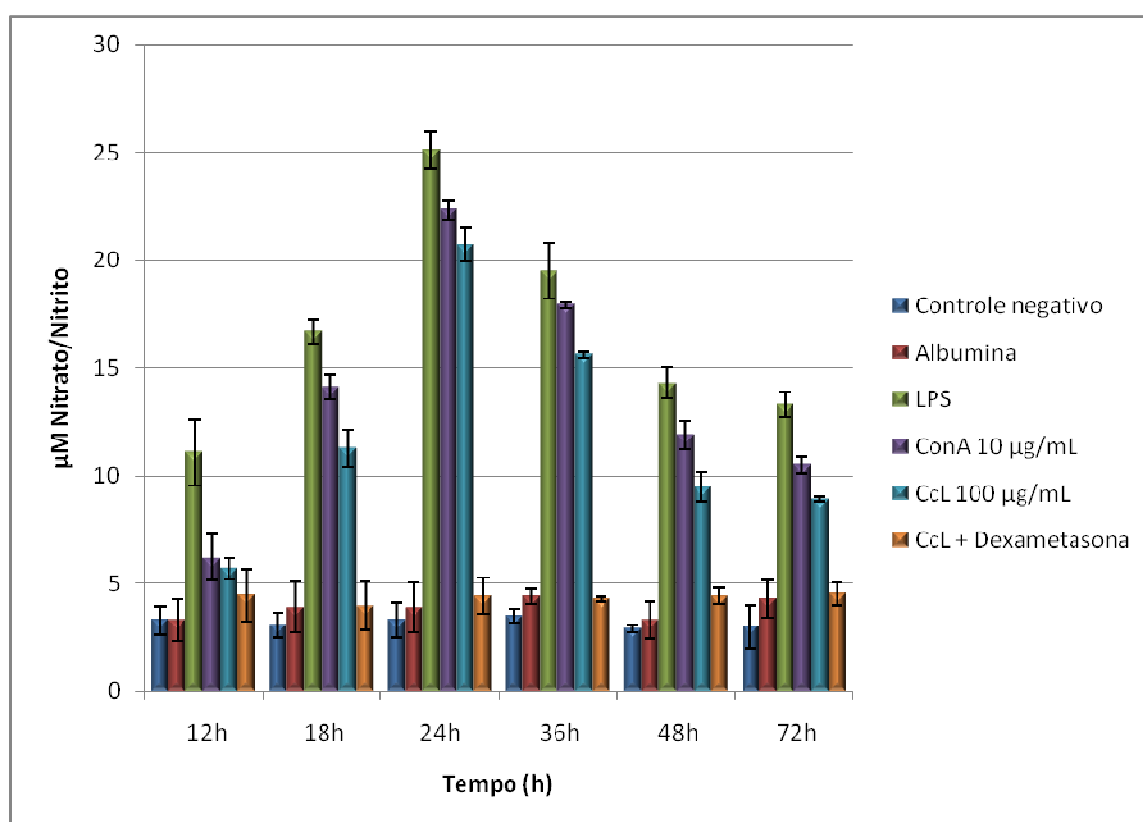


Figura 13: Cinética de tempo da produção de NO por macrófagos. Os tratamentos foram: LPS, ConA (10 $\mu\text{g/ml}$), CcL (100 $\mu\text{g/mL}$) e CcL(100 $\mu\text{g/mL}$) + dexametasona. Os resultados foram representados como média \pm DP da triplicata.

4.14. Indução do edema de pata pela CcL

Após aplicação de CcL nas patas dos camundongos foi observada uma indução dose-dependente do edema, nas concentrações de 1,5, 10 e 50 μg , quando comparadas com as massas das patas controle (salinas). Não houve diferença estatística entre carragenana 1% e a CcL. Este maior valor mostrou então que CcL tem um potencial pró-inflamatório tão significativo quanto a carragenana, um conhecido potente agente pró-inflamatório.

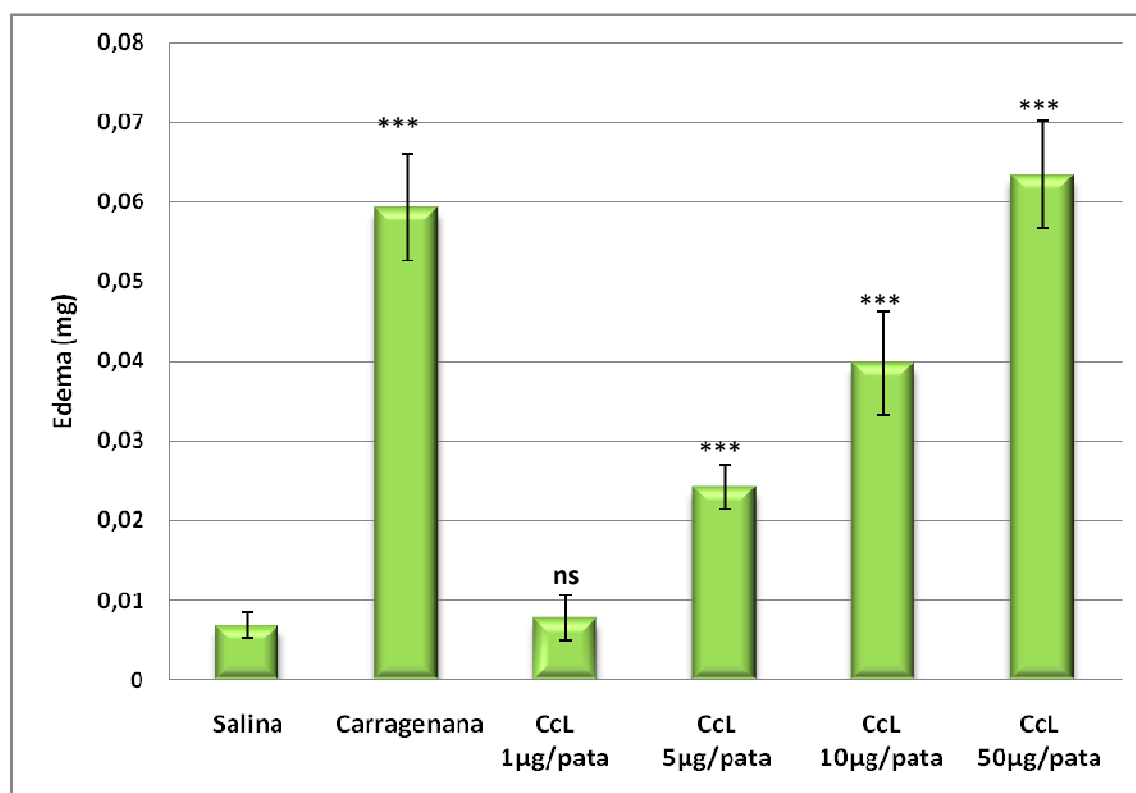


Figura 14: Edema de pata em camundongo induzido por CcL. Concentrações variando de 1 a 50 μg /pata. *** $p < 0,001$ indica um aumento significativo entre a massa do edema do grupo salina e os grupos em que a CcL administrada nas concentrações de 5, 10 e 50 μg /pata. Não houve diferença significativa entre o grupo salina e o grupo em que a CcL foi administrada na concentração de 1 μg /pata. As análises foram feitas 4h após a injeção. Cada coluna representa os valores médios \pm DP, $n=6$.

4.15. Efeitos da CcL sobre a proliferação celular

A viabilidade de células MDA 435, HepG2 e 3T3 foi analisada após incubação por 72 horas com concentrações crescentes de CcL (0,5 a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Após este período foi possível observar a diminuição estatisticamente significativa da viabilidade das células HepG2 em resposta à CcL. O valor de IC_{50} (a dose que diminui a viabilidade celular em 50%) foi obtido com CcL na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (FIGURA 14). Entretanto a CcL não promoveu alteração estatisticamente significativa na proliferação de células MDA 435 e apenas uma pequena alteração na proliferação das células 3T3 foi verificada na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

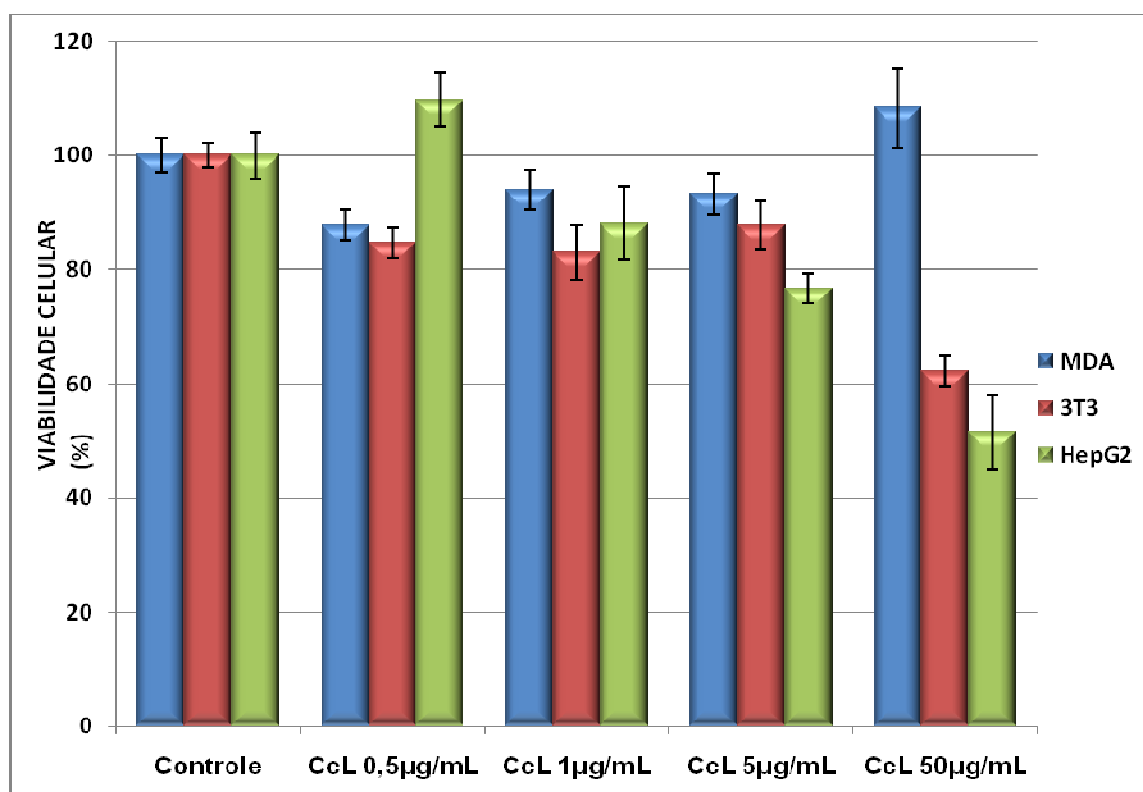


Figura 15: Citotoxicidade da CcL em células HepG2 avaliada pelo teste de redução de MTT. As células foram tratadas com diferentes concentrações de CcL (0,5-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 72h em microplacas de cultura. A viabilidade das células tratadas com CcL foi expressa como porcentagem da viabilidade das células controles não tratadas. Os resultados foram representados como média \pm DP da quadruplicata.

DISCUSSÃO

Os cogumelos são um grupo especial de macrofungos com corpos de frutificação proeminentes e são abundantes em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Ho *et al.*, 2004). Mais de 50 lectinas de fungos têm sido relatadas (Wang; Ng; Ooi, 1998) e na última década, um número crescente dessas lectinas tem sido isolado como em *Boletopsis leucomelas* (Koyama *et al.*, 2002), *Agrocybe aegerita* (Zhao *et al.*, 2003), *Ciborinia camelliae* (Otta *et al.*, 2002), *Clitocybe nebularis* (Pohleven *et al.*, 2009), *Cordyceps militaris* (Jung *et al.*, 2007), *Inocybe umbrinella* (Zhao; Wang; Ng, 2009), *Armillaria luteo-virens* (Feng, *et al.*, 2006), *Schizophyllum commune* (Han *et al.*, 2005), *Pleurotus citrinopileatus* (Li, *et al.*, 2008), *Pholiota adiposa* (Zhang *et al.*, 2009), *Ganoderma capense* (Ngai; Ng, 2004) e *Russula lepida* (Zhang *et al.*, 2010). Essas lectinas têm diferentes subunidades, massas moleculares, especificidades de ligação de açúcares e atividades biológicas.

A lectina purificada do fungo *Clavaria cristata* apresentou uma massa molecular de aproximadamente 140,0 kDa, determinada por cromatografia de gel filtração em Superose 6 10 300 GL em sistema de FPLC-AKTA. Este valor encontra-se dentro da ampla faixa de massas moleculares para lectinas de fungos que está compreendida entre 12,4 kDa e 190 kDa (Guillot; Kanska, 1997), que são referentes à massa molecular de uma proteína com atividade hemaglutinante isolada do micélio do fungo *Ganoderma lucidum* (Tanaka *et al.*, 1989) e para a lectina do fungo *Laetiporus sulphureus* (Kanska, *et al.*, 1994), respectivamente. A análise eletroforética da CcL em condições não desnaturantes (PAGE), permitiu a visualização de apenas uma banda protéica, demonstrando a homogeneidade da lectina purificada. Em condições desnaturantes (SDS-PAGE), uma banda com massa molecular por volta de 66kDa foi observada, porém após aquecimento da amostra e na presença de agente redutor (β -mercaptoetanol) foi observada uma banda protéica com massa molecular de aproximadamente 14,5 kDa. Esse fato indica que sua estrutura quaternária é estabilizada apenas por ligações fracas, não apresentando pontes dissulfeto em sua estrutura. De acordo com essas eletroforeses e com a massa molecular nativa obtida por cromatografia de gel filtração, conclui-se que a banda de cerca de 66 kDa se deve

provavelmente a dois dímeros de 4 subunidades de ~14,5 kDa e que a CcL provavelmente é uma lectina multimérica. Resultado semelhante a respeito de lectinas multiméricas foi relatado para a lectina de *Oncorhynchus mykiss* (Jensen *et al.*, 1997) que apresenta uma estrutura multimérica composta de um número variável de polipeptídios idênticos com massas moleculares de 16 kDa.

A maioria das lectinas de fungos é composta por subunidades, porém as lectinas de *Auricularia polytricha*, *Boletus satanas*, *Coprinus cinereus*, *Ganoderma lucidum*, *Laccaria amethystine*, *Psathyrella laurymabunda*, *Psathyrella velutina*, e *Xerocomus chrysenteron* consistem somente de uma cadeia polipeptídica (Wang; Ng; Ooi, 1998). Aproximadamente, 80% das lectinas de fungos conhecidas têm subunidades com massa molecular em torno de 16kDa e somente as lectinas de *Aleuria aurantia*, *Boletus satanas*, *Laetiporus sulfureus*, *Pleurotus ostreatus*, *Psathyrella lacrymabunda*, *P. velutina*, e *Rigidoporus lignosus* apresentaram subunidades com massa molecular entre 36 kDa e 63 kDa (Wang; Ng; Ooi, 1998).

CcL promoveu aglutinação de todos os tipos de eritrócitos humanos principalmente quando tratados com a enzima tripsina, o que difere da maioria das lectinas de fungos relatadas na literatura em que apenas eritrócitos humanos tratados com pronase foram aglutinados, como as lectinas das espécies *Fusarium solani* (Khan; Ahmad; Khan, 2007), *Macrophomina phaseolina* (Bhowal; Guha; Chatterjee, 2005), *Amanita patherina* (Zhuang *et al.*, 1996), e *Ganoderma lucidum* (Thakur *et al.*, 2007).

A atividade hemaglutinante da CcL mostrou ser dependente de íons cálcio, resultado semelhante ao observado para a lectina do fungo fitopatogênico *Macrophomina phaseolina* (Bhowal; Guha; Chatterjee, 2005), mas difere dos resultados obtidos para as lectinas das espécies *Pleurotus citrinopileatus* (Li, *et al.*, 2008), *Xylaria hipoxylon* (Liu; Wang; Ng, 2006), *Ganoderma capense* (Patrick; Ngai; Ng, 2003), *Cordyceps militaris* (Jung, *et al.*, 2007), *Amanita patherina* (Zhuang, *et al.*, 1996), *Chlorophyllum molybdites* (Kobayashi *et al.*, 2004), *Lactarius rufus* (Panchak; Antoniuk, 2007) e *Hericium erinaceum* (Kawagishi *et al.*, 1994) que não apresentaram alteração da atividade hemaglutinante na presença de íons bivalentes.

A alta termoestabilidade observada da CcL foi relatada também para as lectinas dos fungos *Tricholomas mongolicum* (Wang, *et al.*, 1995), *Volvariella volvacea* (Lin;

Chou, 1984), e *Ganoderma capense* (Patrick; Ngai; Ng, 2003), *Pleurotus cornucopiae* (Oguri; Yoshida; Nagata, 1994), *Boletus edulis* (Feng, et al., 2006) e *Russula lépida* (Zhang, et al., 2010) 2010). A termoestabilidade da CcL foi bem superior comparado com as lectinas dos fungos *Agrocybe aegerita* (Sun et al., 2003), *Xylaria hipoxylon* (Liu; Wang; Ng, 2006), *Xerocomus spadiceus* (Liu; Wang; Ng, 2004), *Peziza sylvestris* (Wang; Ng, 2005), *Cordyceps militaris* (Jung, et al., 2007)), *Boletus edulis* (Zheng et al, 2007) e *Schizophyllum commune* (Han, et al., 2005), *Inocybe umbrinella* (Zhao; Wang; Ng, 2009).

A CcL manteve sua atividade hemaglutinante constante quando submetida a uma ampla faixa de pH que variou entre 2,5 e 11,5. Isto demonstra a importância de um composto que apresente uma boa biodisponibilidade e estabilidade em diferentes pH, inclusive o pH fisiológico. Resultados semelhantes foram observados nas lectinas dos fungos *Schizophyllum commune* (Chumkhunthod et al., 2006), *Ganoderma capense* (Patrick; Ngai; Ng, 2003), *Agaricus campestris* (Sage; Connett, 1969), *Lactarius rufus* (Panchak; Antoniuk, 2007), *Pleurotus cornucopiae* (Oguri; Yoshida; Nagata, 1994) .

A lectina do fungo *C. cristata* apresentou uma atividade específica de 3938,46 UH/mg e grau de purificação de 115 vezes. A atividade hemaglutinante da CcL foi 100% inibida pelas glicoproteínas asialofetúina, BSM e asialo-BSM sendo a glicoproteína BSM a que apresentou o maior potencial de inibição com concentração inibitória mínima de 0,156 mg/mL. BSM contém os ácidos siálicos N-acetil-neuramínico, N-glicolil-neuramínico, N-acetil 9-O-acetil-neuramínico e 8,9 di-O-acetil-neuramínico (Schauer, 1982), sendo destes 65% de O-acetilneuramínico, e através do ensaio de inibição da hemaglutinação provou ser um potente inibidor. Por outro lado, PSM que contém 90% de ácido glicolil-neuramínico e 10% de N-acetil- neuramínico e traços de N- acetil-O-neuramínico (Fragkiadakis; Stratakis, 1995) apresentou uma atividade inibitória mais fraca. A diferença na composição em N-acetil-O-neuramínico entre as duas glicoproteínas pode estar relacionada à diferença na atividade inibitória para CcL. Asialofetúina apresenta ligações não específicas de grupos acetil conjugados a proteínas e outros açúcares. Este resultado é semelhante à lectina específica para ácido siálico do caranguejo *Paratelphusa jacquemontii* (Denis, et al., 2003) e para

lectinas ligantes a mucina (Banerjee *et al.*, 2004; Belogortseva *et al.*, 1998a; Belogortseva *et al.*, 1998b; Nagano *et al.*, 2005; Sampaio; Rogers; Barwell, 1998; Xiong *et al.*, 2006). Lectinas de fungos que se ligam a glicoproteínas também têm sido relatadas para outras espécies como *Amanita patherina* (Zhuang, *et al.*, 1996), *Chlorophyllum molybdites*. (Kobayashi, *et al.*, 2004) e *Ganoderma lucidum* (Thakur, *et al.*, 2007), mas também têm sido relatadas com atividade hemaglutinante não afetadas por açúcares simples e inibidas somente por glicoproteínas como as do fungo *Volvariella volvacea* (Lin; Chou, 1984), *Mycoleptodonoids aitchisonii* (Kawagishi *et al.*, 2001) e *Lactarius lignyotus* (Vidari *et al.*, 1995). Algumas das lectinas isoladas de fungos fitopatogênicos têm especificidade para açúcares complexos, tais como os de mucina e fetuína. (Khan; Ahmad; Khan, 2007).

Um número cada vez maior de evidências tem mostrado que lectinas de diferentes origens podem interferir a resposta imune do hospedeiro. Compostos que modulam as funções dos macrófagos, atuando como imunomoduladores aumentam ou prolongam a duração da resposta imune específica são de grande interesse (Muller, *et al.*, 1996). O tratamento de ConA ativou macrófagos e neutrófilos gerando um aumento na produção de ROS e RNS (Brummer; Sugar; Stevens, 1983; Cameron; Nelson; Forman, 1983; Dorio; Forman, 1988; Fernandis; Subrahmanyam, 1998; Forman; Torres, 2001; Matsubara *et al.*, 1983; Matsubara; Hirohata, 1983; Ohta *et al.*, 1992; Rodrigues *et al.*, 2002; Stoika *et al.*, 2001). Fitohemaglutinina (PHA), até então, demonstrou ativar somente células T (Abraham *et al.*, 1987; Pahlavani, 1998). O tratamento com a aglutinina do gérmen de trigo (WGA) também promoveu a ativação de macrófagos (Tomioka; Saito, 1987). Neste trabalho, verificou-se que a lectina do fungo *Clavaria cristata* induziu a ativação de macrófagos *in vitro* com conseqüente liberação de óxido nítrico.

Os macrófagos constituem o grupo principal de leucócitos fagocitários e são cruciais para a vigilância imune contra a invasão de patógenos. Sob ativação, macrófagos expressam uma ou mais moléculas efetoras citotóxicas, tais como, peroxidase, óxido nítrico e citocinas pró-inflamatórias (Adams; Hamilton, 1984; Klostergaard; Leroux; Hung, 1991). Sendo assim, a ativação de macrófagos é essencial para cumprir seu papel na defesa do hospedeiro. A produção de óxido nítrico pelos

macrófagos é um dos principais mecanismos efetores de citotoxicidade celular (Hibbs *et al.*, 1988; Klostergaard; Leroux; Hung, 1991). O NO produzido por eles é um importante mensageiro químico para a indução de muitas respostas biológicas (Wasser *et al.*, 2005). CcL induziu a ativação de macrófagos murinos atingindo a máxima produção de NO no tempo de 24h. Um leve declínio observado na produção de óxido nítrico após o pico de 24h pode ser devido à acidificação do meio de cultura resultando em desestabilidade do nitrito (Sodhi; Biswas, 2002).

Até agora, somente poucos pesquisadores têm mostrado a relação entre lectinas e a produção de NO (Wong; Ng, 2006). A ativação de macrófagos com conseqüente liberação de óxido nítrico induzida pela CcL foi observada também para as lectinas ConA (Keshewani; Sodhi, 2007), lectina da banana imperador EBL (Wong; Ng, 2006) e lectina do visco coreano (KML) (Lee *et al.*, 2009). Esses dados são de grande importância visto que macrófagos são células efectoras contra microrganismos intracelulares, então sua ativação é essencial para o controle da infecção. Ainda, corroborando os resultados do presente trabalho, as lectinas do fungo *Tricholomas mongolicum*, TML-1 e TML-2, apresentaram também atividade imunomodulatória estimulando a produção de íons nitrito e ativando macrófagos murinos a produzir fator de necrose tumoral (Wang *et al.*, 1996) apresentando assim atividade antitumoral.

O potencial pró-inflamatório da CcL foi determinado em um modelo de edema de pata utilizando a carragenana como indutor da hiperalgisia inflamatória. A inflamação induzida pela carragenana é um processo muito complexo envolvendo um grande número de mediadores inflamatórios. Dentre esses mediadores podemos destacar produtos do metabolismo do ácido araquidônico (Blackham *et al.*, 1979), conteúdos de mastócitos (Histamina 5-HT) (Buritova *et al.*, 1997; Di-Rosa; Sorrentino, 1968; Kocher *et al.*, 1987), neurocininas (substância P) (Coderre; Melzack, 1991) citocinas (IL-1 β) (Ivanaro *et al.*, 1999) e óxido nítrico (Salvemini *et al.*, 1996). Entretanto, o papel exato de cada um desses componentes na inflamação induzida por carragenana não está ainda bem definido. No resultado obtido pelo modelo de edema de pata induzido pela CcL foi verificado que na dose de 50 μ g/pata foi observado que as patas tiveram a mesma massa daquelas injetadas com carragenana 1% após 4h. Resultados semelhantes foram observados para a lectina da esponja marinha *Cliona varians* (CvL) (Queiroz *et*

al., 2008) e para lectinas de origem vegetal como as das sementes de *Talisia esculenta* (Freire *et al.*, 2003), *Artocarpus integrifolia* (Santos-De-Oliveira *et al.*, 1994) e da *Erythrina velutina* (Moraes *et al.*, 1996). As interações carboidrato-proteína ocorrem em um número de processos bioquímicos em diferentes tipos celulares tais como linfócitos, macrófagos e mastócitos (Andrade *et al.*, 1999; Lis; Sharon, 1986; Serke; Huhn, 1990). Acredita-se que essas interações sirvam como sinais nessas células causando a liberação de mediadores pró-inflamatórios, tais como, citocinas, óxido nítrico, leucotrienos e PAF (Benjamin *et al.*, 1997). A descoberta de lectinas pró-inflamatórias indicam que elas podem ser utilizadas como ferramentas para melhor compreender os mecanismos envolvidos nas respostas inflamatórias e nos eventos celulares de inflamação.

As propriedades anticâncer têm sido demonstradas *in vitro* e *in vivo* sugerindo um possível papel das lectinas como agentes terapêuticos (Yan *et al.*, 2009). CcL apresentou atividade antiproliferativa para a linhagem celular HepG2 após incubação por 72h com a lectina, apresentando um valor de IC₅₀ de 50µg/mL. Resultados semelhantes foram observados para atividade antiproliferativa em células HepG2 das lectinas dos fungos *Russula lepida* (Zhang, *et al.*, 2010), *Clitocybe nebularis* (Pohleven, *et al.*, 2009), *Inocybe umbrinella* (Zhao; Wang; Ng, 2009); *Pholiota adiposa* (Zhang, *et al.*, 2009) e as lectinas de origem vegetal, *Phaseolus vulgaris* cultivar feijão francês (Lam; Ng, 2010), feijão de ervilha (Wong; Ng, 2006), das raízes de *Astragalus mongholicus* (Yan, *et al.*, 2009), e da membrana de *Astragalus mongholicus* (Yan *et al.*, 2010). As diferenças na especificidade a açúcares apresentada pelas diferentes lectinas podem refletir em diferenças nas suas atividades antiproliferativas (Dhuna, *et al.*, 2007; Kaur *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2007; Singh; Singh; Kamboj, 2004; Yan, *et al.*, 2009).

Esta é a primeira vez na literatura que é descrito a purificação e caracterização de uma lectina do fungo *C. cristata*. Suas características bioquímicas, como alta termoestabilidade, atividade hemaglutinante independente da variação de pH (entre 2,5 e 11,5), dependência de íons cálcio e inibição por mucina bovina (BSM), associado a seus efeitos imunomodulatório e antiproliferativo, torna a CcL uma molécula promissora

para o estudo a nível molecular de suas propriedades tumorigênicas e as vias para atividade imunomodulatória de acordo com a interação lectina-carboidrato.

6. CONCLUSÕES

- Uma lectina foi purificada do fungo *Clavaria cristata* (CcL) e apresentou atividade hemaglutinante preferencial para os eritrócitos do tipo O, submetidos ao tratamento com tripsina.
- CcL apresentou atividade hemaglutinante dependente de íons cálcio;
- A glicoproteína BSM na concentração de 0,125 mg/mL inibiu fortemente a atividade hemaglutinante de CcL;
- A massa molecular da lectina, determinada em condições nativas por gel filtração Superose 6 10 300 GL foi de 140,0 kDa;
- Em SDS-PAGE, a CcL apresentou uma única banda com massa molecular de 14,5 kDa quando aquecida a 100 °C, sugerindo uma organização multimérica em subunidades;
- A atividade hemaglutinante da lectina foi termoestável, até 80 °C, e apresentou estabilidade a uma ampla faixa de pH, de 2,5 a 11,5;
- CcL induziu a ativação de macrófagos murinos *in vitro* com conseqüente liberação de óxido nítrico, atingindo a máxima produção no tempo de 24h;
- A lectina do fungo apresentou atividade pró-inflamatória sendo capaz de induzir a formação de edema de pata em camundongos;
- CcL apresentou um efeito antiproliferativo para a linhagem de células HepG2 com o IC₅₀ de 50µg/mL .

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. *Imunologia Celular e Molecular*. 3ª ed., Editora Revinter, Rio de Janeiro, 2000. v., n., p., 2000.

ABRAHAM, R. T.; HO, S. N.; BARNA, T. J.; MCKEAN, D. J. Transmembrane signaling during interleukin 1-dependent T cell activation. Interactions of signal 1- and signal 2-type mediators with the phosphoinositide-dependent signal transduction mechanism. **J Biol Chem**. v. 262, n. 6, p. 2719-2728, 1987.

ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The cell biology of macrophage activation. **Annu Rev Immunol**. v. 2, n., p. 283-318, 1984.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. *Biologia molecular da célula*. 3ª ed. Ed. Artes Médicas. Porto Alegre, 1997.

ALBINA, J. E.; REICHNER, J. S. Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. **Cancer Metastasis Rev**. v. 17, n. 1, p. 39-53, 1998.

ALEXOPOULOS, C. J.; CHARLES W. MIMS; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4th ed., . v. ISBN -52229-5., n., p. 0-471, 2004.

ANDRADE, J. L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M. V.; CAVADA, B. S.; BARRAL-NETTO, M. Lectin-induced nitric oxide production. **Cell Immunol**. v. 194, n. 1, p. 98-102, 1999.

ANDRIANIFAHANANA, M.; MONIAUX, N.; BATRA, S. K. Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. **Biochim Biophys Acta**. v. 1765, n. 2, p. 189-222, 2006.

ASHWELL, G.; HARFORD, J. Carbohydrate-specific receptors of the liver. **Annu Rev Biochem**. v. 51, n., p. 531-554, 1982.

BANERJEE, S.; CHAKI, S.; BHOWAL, J.; CHATTERJEE, B. P. Mucin binding mitogenic lectin from freshwater Indian gastropod *Belamya bengalensis*: purification and molecular characterization. **Arch Biochem Biophys**. v. 421, n. 1, p. 125-134, 2004.

BELOGORTSEVA, N.; MOLCHANOVA, V.; GLAZUNOV, V.; EVTUSHENKO, E.; LUK'YANOV, P. N-Acetyl-D-glucosamine-specific lectin from the ascidian *Didemnum ternatanum*. **Biochim Biophys Acta**. v. 1380, n. 2, p. 249-256, 1998a.

BELOGORTSEVA, N. I.; MOLCHANOVA, V. I.; KURIKA, A. V.; SKOBUN, A. S.; GLAZKOVA, V. E. Isolation and characterization of new GalNAc/Gal-specific lectin from the sea mussel *Crenomytilus grayanus*. **Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol**. v. 119, n. 1, p. 45-50, 1998b.

BENJAMIN, N.; PATTULLO, S.; WELLER, R.; SMITH, L.; ORMEROD, A. Wound licking and nitric oxide. **Lancet**. v. 349, n. 9067, p. 1776, 1997.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Mol Immunol**. v. 40, n. 12, p. 845-859, 2004.

BHOWAL, J.; GUHA, A. K.; CHATTERJEE, B. P. Purification and molecular characterization of a sialic acid specific lectin from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. **Carbohydr Res**. v. 340, n. 12, p. 1973-1982, 2005.

BLACKHAM, A.; HALL, D. E.; MANN, J.; WOODS, A. M. Effect of cyclo-oxygenase inhibitors in models of acute and chronic inflammation. **Agents Actions Suppl**. v., n. 4, p. 193-201, 1979.

BRUMMER, E.; SUGAR, A. M.; STEVENS, D. A. Activation of peritoneal macrophages by concanavalin A or *Mycobacterium bovis* BCG for fungicidal activity against *Blastomyces dermatitidis* and effect of specific antibody and complement. **Infect Immun**. v. 39, n. 2, p. 817-822, 1983.

BURITOVA, J.; CHAPMAN, V.; HONORE, P.; BESSON, J. M. The contribution of peripheral bradykinin B2 receptors to carrageenan-evoked oedema and spinal c-Fos expression in rats. **Eur J Pharmacol**. v. 320, n. 1, p. 73-80, 1997.

CADENAS, S.; CADENAS, A. M. Fighting the stranger-antioxidant protection against endotoxin toxicity. **Toxicology**. v. 180, n. 1, p. 45-63, 2002.

CAMERON, A. R.; NELSON, J.; FORMAN, H. J. Depolarization and increased conductance precede superoxide release by concanavalin A-stimulated rat alveolar macrophages. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 80, n. 12, p. 3726-3728, 1983.

CHIHARA, G. Recent progress in immunopharmacology and therapeutic effects of polysaccharides. **Dev Biol Stand**. v. 77, n., p. 191-197, 1992.

CHUMKHUNTHOD, P.; RODTONG, S.; LAMBERT, S. J.; FORDHAM-SKELTON, A. P.; RIZKALLAH, P. J.; WILKINSON, M. C.; REYNOLDS, C. D. Purification and characterization of an N-acetyl-D-galactosamine-specific lectin from the edible mushroom *Schizophyllum commune*. **Biochim Biophys Acta**. v. 1760, n. 3, p. 326-332, 2006.

CODERRE, T. J.; MELZACK, R. Central neural mediators of secondary hyperalgesia following heat injury in rats: neuropeptides and excitatory amino acids. **Neurosci Lett**. v. 131, n. 1, p. 71-74, 1991.

COOPER, D. N.; BOULIANNE, R. P.; CHARLTON, S.; FARRELL, E. M.; SUCHER, A.; LU, B. C. Fungal galectins, sequence and specificity of two isolectins from *Coprinus cinereus*. **J Biol Chem.** v. 272, n. 3, p. 1514-1521, 1997.

DE MEJIA, E. G.; PRISECARU, V. I. Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment. **Crit Rev Food Sci Nutr.** v. 45, n. 6, p. 425-445, 2005.

DEBRAY, H.; DUS, D.; WIERUSZESKI, J. M.; STRECKER, G.; MONTREUIL, J. Structures of the alpha(1-3)-galactose-containing asparagine-linked glycans of a Lewis lung carcinoma cell subline resistant to *Aleuria aurantia* agglutinin: elucidation by 1H-NMR spectroscopy. **Glycoconj J.** v. 8, n. 1, p. 29-37, 1991.

DENIS, M.; PALATY, P. D.; BAI, N. R.; SURIYA, S. J. Purification and characterization of a sialic acid specific lectin from the hemolymph of the freshwater crab *Paratelphusa jacquemontii*. **Eur J Biochem.** v. 270, n. 21, p. 4348-4355, 2003.

DHUNA, V.; KAMBOJ, S. S.; KAUR, A.; SAXENA, A. K.; BHIDE, S. V.; SHANMUGAVEL; SINGH, J. Characterization of a lectin from *Gonatanthus pumilus* D. Don having anti-proliferative effect against human cancer cell lines. **Protein Pept Lett.** v. 14, n. 1, p. 71-78, 2007.

DI ROSA, M.; SORRENTINO, L. The mechanism of the inflammatory effect of carrageenin. **Eur J Pharmacol.** v. 4, n. 3, p. 340-342, 1968.

DORIO, R. J.; FORMAN, H. J. Ethanol inhibition of signal transduction in superoxide production by rat alveolar macrophages. A proposed mechanism for ethanol related pneumonia. **Ann Clin Lab Sci.** v. 18, n. 3, p. 190-194, 1988.

ERWIG, L. P.; KLUTH, D. C.; WALSH, G. M.; REES, A. J. Initial cytokine exposure determines function of macrophages and renders them unresponsive to other cytokines. **J Immunol.** v. 161, n. 4, p. 1983-1988, 1998.

FARZANEH-FAR, R.; MOORE, K. Nitric oxide and the liver. **Liver.** v. 21, n. 3, p. 161-174, 2001.

FENG, K.; LIU, Q. H.; NG, T. B.; LIU, H. Z.; LI, J. Q.; CHEN, G.; SHENG, H. Y.; XIE, Z. L.; WANG, H. X. Isolation and characterization of a novel lectin from the mushroom *Armillaria luteo-virens*. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 345, n. 4, p. 1573-1578, 2006.

FERNANDIS, A. Z.; SUBRAHMANYAM, G. Concanavalin A modulates tyrosine phosphorylation and activation of a type II phosphatidylinositol 4-kinase in rat splenic lymphocytes. **Mol Immunol.** v. 35, n. 14-15, p. 935-941, 1998.

- FORD, W. W. The distribution of haemolysis agglutinins and poisons in fungi, especially the Amanitas, the Entolomas, the Lactarius and the Inocybes. . **J Pharmacol Exp Ther.** v. 2, n., p. 285-318, 1910.
- FORMAN, H. J.; TORRES, M. Redox signaling in macrophages. **Mol Aspects Med.** v. 22, n. 4-5, p. 189-216, 2001.
- FRAGKIADAKIS, G. A.; STRATAKIS, E. K. Characterization of hemolymph lectins in the prawn *Peripenaeus longirostris*. . **J Invertebr Pathol.** v. 65, n., p. 111–117, 1995.
- FREIRE, M. G.; DESOUSA, I. A.; SILVA, A. C.; MACEDO, M. L.; LIMA, M. S.; TAMASHIRO, W. M.; ANTUNES, E.; MARANGONI, S. Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds. **Toxicon.** v. 42, n. 3, p. 275-280, 2003.
- GABIUS, H. J. Concepts of tumor lectinology. **Cancer Invest.** v. 15, n. 5, p. 454-464, 1997.
- GABIUS, H. J.; ANDRE, S.; KALTNER, H.; SIEBERT, H. C. The sugar code: functional lectinomics. **Biochim Biophys Acta.** v. 1572, n. 2-3, p. 165-177, 2002.
- GARTNER, L. P.; SAAD, A. Y.; HIATT, J. L. Effects of nicotine on tongue development in the CD-1 mouse. **Eur J Morphol.** v. 35, n. 5, p. 337-343, 1997.
- GILBOA-GARBER, N.; SUDAKEVITZ, D. The hemagglutinating activities of *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-IIL exhibit opposite temperature profiles due to different receptor types. **FEMS Immunol Med Microbiol.** v. 25, n. 4, p. 365-369, 1999.
- GLICK, G. D.; TOOGOOD, P. L.; WILEY, D. C.; SKEHEL, J. J.; KNOWLES, J. R. Ligand recognition by influenza virus. The binding of bivalent sialosides. **J Biol Chem.** v. 266, n. 35, p. 23660-23669, 1991.
- GOMEZ-FLORES, R.; WEBER, R. J. Immunomodulation of macrophage functions by opioids. **Adv Exp Med Biol.** v. 437, n., p. 13-19, 1998.
- GORDON, S.; PERRY, V. H.; RABINOWITZ, S.; CHUNG, L. P.; ROSEN, H. Plasma membrane receptors of the mononuclear phagocyte system. **J Cell Sci Suppl.** v. 9, n., p. 1-26, 1988.
- GREEN, S. J.; MELTZER, M. S.; HIBBS, J. B., JR.; NACY, C. A. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. **J Immunol.** v. 144, n. 1, p. 278-283, 1990.
- GUILLOT, J.; KONSKA, G. Lectins in higher fungi. **Biochem Syst Ecol.** . v. 25, n., p. 203-230, 1997.

HADDEN, J. W. Immunodeficiency and cancer: prospects for correction. **Int Immunopharmacol.** v. 3, n. 8, p. 1061-1071, 2003.

HAN, C. H.; LIU, Q. H.; NG, T. B.; WANG, H. X. A novel homodimeric lactose-binding lectin from the edible split gill medicinal mushroom *Schizophyllum commune*. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 336, n. 1, p. 252-257, 2005.

HAN, K. S.; KANG, H. J.; KIM, E. Y.; YOON, W. J.; SOHN, S.; KWON, H. J.; GWAG, B. J. 1,2-bis(2-Aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid induces caspase-mediated apoptosis and reactive oxygen species-mediated necrosis in cultured cortical neurons. **J Neurochem.** v. 78, n. 2, p. 230-239, 2001.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1,5 million species estimate revised. **Mycol Res.** v. 105 n., p. 1422-1432, 2001.

HIBBETT, D. S.; BINDER, M.; BISCHOFF, J. F.; BLACKWELL, M.; CANNON, P. F.; ERIKSSON, O. E.; HUHDORF, S.; JAMES, T.; KIRK, P. M.; LUCKING, R.; THORSTEN LUMBSCH, H.; LUTZONI, F.; MATHENY, P. B.; MCLAUGHLIN, D. J.; POWELL, M. J.; REDHEAD, S.; SCHOCH, C. L.; SPATAFORA, J. W.; STALPERS, J. A.; VILGALYS, R.; AIME, M. C.; APTROOT, A.; BAUER, R.; BEGEROW, D.; BENNY, G. L.; CASTLEBURY, L. A.; CROUS, P. W.; DAI, Y. C.; GAMS, W.; GEISER, D. M.; GRIFFITH, G. W.; GUEIDAN, C.; HAWKSWORTH, D. L.; HESTMARK, G.; HOSAKA, K.; HUMBER, R. A.; HYDE, K. D.; IRONSIDE, J. E.; KOLJALG, U.; KURTZMAN, C. P.; LARSSON, K. H.; LICHTWARDT, R.; LONGCORE, J.; MIADLIKOWSKA, J.; MILLER, A.; MONCALVO, J. M.; MOZLEY-STANDRIDGE, S.; OBERWINKLER, F.; PARMASTO, E.; REEB, V.; ROGERS, J. D.; ROUX, C.; RYVARDEN, L.; SAMPAIO, J. P.; SCHUSSLER, A.; SUGIYAMA, J.; THORN, R. G.; TIBELL, L.; UNTEREINER, W. A.; WALKER, C.; WANG, Z.; WEIR, A.; WEISS, M.; WHITE, M. M.; WINKA, K.; YAO, Y. J.; ZHANG, N. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. **Mycol Res.** v. 111, n. Pt 5, p. 509-547, 2007.

HIBBS, J. B., JR.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN, Z.; RACHLIN, E. M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 157, n. 1, p. 87-94, 1988.

HO, J. C.; SZE, S. C.; SHEN, W. Z.; LIU, W. K. Mitogenic activity of edible mushroom lectins. **Biochim Biophys Acta.** v. 1671, n. 1-3, p. 9-17, 2004.

HOHL, H. R.; BALSIGER, S. A. A model system for the study of fungus host surface interactions: adhesion of *Phytophthora megasperma* to protoplasts and mesophyll cells soybean. **Nato Asi.** v. 4, n., p. 259-272, 1986.

HONG, S. H.; JEONG, H. J.; CHUNG, H. S.; KIM, H. R.; CHAE, H. J.; SHIN, T.; SEO, Y.; KIM, H. M. An herbal formula, HerbKines, enhances cytokines production from immune cells. **J Ethnopharmacol.** v. 98, n. 1-2, p. 149-155, 2005.

IANARO, A.; O'DONELL, C. A.; DI-ROSA, M.; LIEW, F. Y. A nitric oxide synthase inhibitor reduces inflammation, down-regulates inflammatory cytokines and enhances interleukin-10 production in carrageenin-induced oedema in mice. **Immunology**. v. 82, n., p. 370-375, 1999.

HYDE, K. D. Can we rapidly measure fungal diversity? . **Mycologist**. v. 11, n., p. 176-178, 1997.

HYDE, K. D.; HAWKSWORTH, D. L. Measuring and monitoring the biodiversity of microfungi. **Hong Kong University Press**. v., n., p. 141-156, 1997.

JANEWAY, C. A., JR.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu Rev Immunol**. v. 20, n., p. 197-216, 2002.

JENSEN, L.E.; THIEL, S.; PETERSEN, T.E.; JENSENIUS, J.C. A rainbow trout lectin with multimeric structure. **Comp Biochem Physiol**. v. 116B, n. 4, p. 385-390, 1997.

JUNG, E. C.; KIM, K. D.; BAE, C. H.; KIM, J. C.; KIM, D. K.; KIM, H. H. A mushroom lectin from ascomycete *Cordyceps militaris*. **Biochim Biophys Acta**. v. 1770, n. 5, p. 833-838, 2007.

KAUR, M.; SINGH, K.; RUP, P. J.; KAMBOJ, S. S.; SAXENA, A. K.; SHARMA, M.; BHAGAT, M.; SOOD, S. K.; SINGH, J. A tuber lectin from *Arisaema jacquemontii* Blume with anti-insect and anti-proliferative properties. **J Biochem Mol Biol**. v. 39, n. 4, p. 432-440, 2006.

KAWAGISHI, H.; MITSUNAGA, S.; YAMAWAKI, M.; IDO, M.; SHIMADA, A.; KINOSHITA, T.; MURATA, T.; USUI, T.; KIMURA, A.; CHIBA, S. A lectin from mycelia of the fungus *Ganoderma lucidum*. **Phytochemistry**. v. 44, n. 1, p. 7-10, 1997.

KAWAGISHI, H.; MORI, H.; UNO, A.; KIMURA, A.; CHIBA, S. A sialic acid-binding lectin from the mushroom *Herichium erinaceum*. **FEBS Lett**. v. 340, n. 1-2, p. 56-58, 1994.

KAWAGISHI, H.; TAKAGI, J.; TAIRA, T.; MURATA, T.; USUI, T. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycoleptodonoides aitchisonii*. **Phytochemistry**. v. 56, n. 1, p. 53-58, 2001.

KAWAGISHI, H. M. T. Purification and properties of a β -galactosyl-specific lectin from the fruiting bodies of *Ischnoderma resinosa*. . **FEBS Lett**. . v. 227, n., p. 99-102, , 1988.

KESHERWANI, V.; SODHI, A. Differential activation of macrophages in vitro by lectin Concanavalin A, Phytohemagglutinin and Wheat germ agglutinin: production and regulation of nitric oxide. **Nitric Oxide**. v. 16, n. 2, p. 294-305, 2007.

KHAN, F.; AHMAD, A.; KHAN, M. I. Purification and characterization of a lectin from endophytic fungus *Fusarium solani* having complex sugar specificity. **Arch Biochem Biophys.** v. 457, n. 2, p. 243-251, 2007.

KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochim Biophys Acta.** v. 1572, n. 2-3, p. 187-197, 2002.

KIM, S.; PONKA, P. Nitric oxide-mediated modulation of iron regulatory proteins: implication for cellular iron homeostasis. **Blood Cells Mol Dis.** v. 29, n. 3, p. 400-410, 2002.

KISS, R.; CAMBY, I.; DUCKWORTH, C.; DE DECKER, R.; SALMON, I.; PASTEELS, J. L.; DANGUY, A.; YEATON, P. In vitro influence of *Phaseolus vulgaris*, *Griffonia simplicifolia*, concanavalin A, wheat germ, and peanut agglutinins on HCT-15, LoVo, and SW837 human colorectal cancer cell growth. **Gut.** v. 40, n. 2, p. 253-261, 1997.

KLOSTERGAARD, J.; LEROUX, M. E.; HUNG, M. C. Cellular models of macrophage tumoricidal effector mechanisms in vitro. Characterization of cytolytic responses to tumor necrosis factor and nitric oxide pathways in vitro. **J Immunol.** v. 147, n. 8, p. 2802-2808, 1991.

KOBAYASHI, Y.; KOBAYASHI, K.; UMEHARA, K.; DOHRA, H.; MURATA, T.; USUI, T.; KAWAGISHI, H. Purification, characterization, and sugar binding specificity of an N-Glycolylneuraminic acid-specific lectin from the mushroom *Chlorophyllum molybdites*. **J Biol Chem.** v. 279, n. 51, p. 53048-53055, 2004.

KOCHER, L.; ANTON, F.; REEH, P. W.; HANDWERKER, H. O. The effect of carrageenan-induced inflammation on the sensitivity of unmyelinated skin nociceptors in the rat. **Pain.** v. 29, n. 3, p. 363-373, 1987.

KONSKA, G.; GUILLOT, J.; DUSSER, M.; DAMEZ, M.; BOTTON, B. Isolation and characterization of an N-acetyllactosamine-binding lectin from the mushroom *Laetiporus sulfureus*. **J Biochem.** v. 116, n. 3, p. 519-523, 1994.

KORNFELD, S. Trafficking of lysosomal enzymes. **Faseb J.** v. 1, n., p. 462-468, 1987.

KOTTGEN, E.; HELL, B.; KAGE, A.; TAUBER, R. Lectin specificity and binding characteristics of human C-reactive protein. **J Immunol.** v. 149, n. 2, p. 445-453, 1992.

KOYAMA, Y.; KATSUNO, Y.; MIYOSHI, N.; HAYAKAWA, S.; MITA, T.; MUTO, H.; ISEMURA, S.; AOYAGI, Y.; ISEMURA, M. Apoptosis induction by lectin isolated from the mushroom *Boletopsis leucomelas* in U937 cells. **Biosci Biotechnol Biochem.** v. 66, n. 4, p. 784-789, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the ready bacteriophage T4. **Nature.** 227: 680-685, 1970.

LAM, S.K.; NG, T.B. Isolation and characterization of a French bean hemagglutinin with antitumor, antifungal and anti-HIV reverse transcriptase activities and exceptionally high yield. **Phytomedicine**. v. 17, n. 6, p. 457-462, 2010.

LI, Y. R.; LIU, Q. H.; WANG, H. X.; NG, T. B. A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. **Biochim Biophys Acta**. v. 1780, n. 1, p. 51-57, 2008.

LIENER, I. E.; SHARON, N.; GOLDSTEIN, I. J. The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine. **Academic Press**. v., n., p., 1986.

LIEW, F. Y. Role of cytokines in killing of intracellular pathogens. **Immunol Lett**. v. 30, n. 2, p. 193-197, 1991.

LIN, J. Y.; CHOU, T. B. Isolation and characterization of a lectin from edible mushroom, *Volvariella volvacea*. **J Biochem**. v. 96, n. 1, p. 35-40, 1984.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins as molecules and as tools. **Annu Rev Biochem**. v. 55, n., p. 35-67, 1986.

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

LIU, Q.; WANG, H.; NG, T. B. Isolation and characterization of a novel lectin from the wild mushroom *Xerocomus spadiceus*. **Peptides**. v. 25, n. 1, p. 7-10, 2004.

LIU, Q.; WANG, H.; NG, T. B. First report of a xylose-specific lectin with potent hemagglutinating, antiproliferative and anti-mitogenic activities from a wild ascomycete mushroom. **Biochim Biophys Acta**. v. 1760, n. 12, p. 1914-1919, 2006.

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

LUO, Y.; XU, X.; LIU, J.; LI, J.; SUN, Y.; LIU, Z.; LIU, J.; VAN DAMME, E.; BALZARINI, J.; BAO, J. A novel mannose-binding tuber lectin from *Typhonium divaricatum* (L.) Decne (family Araceae) with antiviral activity against HSV-II and anti-proliferative effect on human cancer cell lines. **J Biochem Mol Biol**. v. 40, n. 3, p. 358-367, 2007.

MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annu Rev Immunol**. v. 15, n., p. 323-350, 1997.

MAINARDI, T.; KAPOOR, S.; BIELORY, L. Complementary and alternative medicine: herbs, phytochemicals and vitamins and their immunologic effects. **J Allergy Clin Immunol**. v. 123, n. 2, p. 283-294; quiz 295-286, 2009.

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annu Rev Immunol.** v. 27, n., p. 451-483, 2009.

MATSUBARA, T.; FUJII, M.; ISHIKAWA, H.; HIROHATA, K. Inhibition of concanavalin A-induced phosphatidylinositol turnover and lysosomal enzyme release by cyclic AMP-elevating agents in rat peritoneal macrophages. **Rheumatol Int.** v. 3, n. 1, p. 29-33, 1983.

MATSUBARA, T.; HIROHATA, K. The role of phosphatidylinositol turnover in initiation of prostaglandin biosynthesis in concanavalin A-induced activation of rat peritoneal macrophages. **Exp Cell Biol.** v. 51, n. 2, p. 77-82, 1983.

MATSUI, T.; HAMAKO, J.; OZEKI, Y.; TITANI, K. Comparative study of blood group-recognizing lectins toward ABO blood group antigens on neoglycoproteins, glycoproteins and complex-type oligosaccharides. **Biochim Biophys Acta.** v. 1525, n. 1-2, p. 50-57, 2001.

MAUEL, J.; RANSIJN, A.; BUCHMULLER-ROUILLER, Y. Killing of Leishmania parasites in activated murine macrophages is based on an L-arginine-dependent process that produces nitrogen derivatives. **J Leukoc Biol.** v. 49, n. 1, p. 73-82, 1991.

MORADALI, M. F.; MOSTAFAVI, H.; GHODS, S.; HEDJAROUDE, G. A. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi). **Int Immunopharmacol.** v. 7, n. 6, p. 701-724, 2007.

MORAES, S. M.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; SANTOS-DE-OLIVEIRA, R.; PINTO, V. P.; OLIVEIRA, J. T. Purification, physicochemical characterization and biological properties of a lectin from *Erythrina velutina* forma aurantiaca seeds. **Braz J Med Biol Res.** v. 29, n. 8, p. 977-985, 1996.

MOREIRA, R. A.; MONTEIRO, A. C. O.; HORTA, A. C. G.; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B.S. Isolation and characterization of *Dioclea altissima* var. *megacarpa* seed lectin. **Phytochemistry.** 46: 139-144, 1997.

MULLER, A.; RICE, P. J.; ENSLEY, H. E.; COOGAN, P. S.; KALBFLEISH, J. H.; KELLEY, J. L.; LOVE, E. J.; PORTERA, C. A.; HA, T.; BROWDER, I. W.; WILLIAMS, D. L. Receptor binding and internalization of a water-soluble (1-->3)-beta-D-glucan biologic response modifier in two monocyte/macrophage cell lines. **J Immunol.** v. 156, n. 9, p. 3418-3425, 1996.

MURADOR, P.; DEFFUNE, E. Structural aspects of the erythrocyte membrane. **Rev. bras. hematol. Hemoter.** v. 29(2), n., p. 168-178, 2007.

NAGANO, C. S.; DEBRAY, H.; NASCIMENTO, K. S.; PINTO, V. P.; CAVADA, B. S.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W. R.; SAMPAIO, A. H.; CALVETE, J. J. HCA and HML isolated from the red marine algae *Hypnea cervicornis* and *Hypnea musciformis* define a novel lectin family. **Protein Sci.** v. 14, n. 8, p. 2167-2176, 2005.

NAGATA, K.; TSUJI, T.; MATSUSHIMA, K.; HANAI, N.; IRIMURA, T. Redistribution of selectin counter-ligands induced by cytokines. **Int Immunol.** v. 12, n. 4, p. 487-492, 2000.

NELSON, J. A.; PARHAR, R. S.; SCODRAS, J. M.; LALA, P. K. Characterization of macrophage subsets regulating murine natural killer cell activity. **J Leukoc Biol.** v. 48, n. 5, p. 382-393, 1990.

NEVEU, P. J. Lateralization and stress responses in mice: interindividual differences in the association of brain, neuroendocrine, and immune responses. **Behav Genet.** v. 26, n. 4, p. 373-377, 1996.

NGAI, P. H.; NG, T. B. A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 314, n. 4, p. 988-993, 2004.

NI, Y.; TIZARD, I. Lectin-carbohydrate interaction in the immune system. **Vet Immunol Immunopathol.** v. 55, n. 1-3, p. 205-223, 1996.

OFEK, I.; SHARON, N. Adhesins as lectins: specificity and role in infection. **Curr Top Microbiol Immunol.** v. 151, n., p. 91-113, 1990.

OGURI, S.; YOSHIDA, M.; NAGATA, Y. Isolation, crystallization, and characterization of a 16.5-kDa protein from fruit bodies of a lectin-deficient strain of *Pleurotus cornucopiae*. **Biosci Biotechnol Biochem.** v. 58, n. 3, p. 502-506, 1994.

OHM, J. E.; CARBONE, D. P. VEGF as a mediator of tumor-associated immunodeficiency. **Immunol Res.** v. 23, n. 2-3, p. 263-272, 2001.

OHTA, T.; NAKAMURA, R.; IKEDA, Y.; SHINOHARA, M.; MIYAZAKI, A.; HORIUCHI, S.; MATSUDA, I. Differential effect of subspecies of lipoprotein containing apolipoprotein A-I on cholesterol efflux from cholesterol-loaded macrophages: functional correlation with lecithin: cholesterol acyltransferase. **Biochim Biophys Acta.** v. 1165, n. 1, p. 119-128, 1992.

OKA, Y.; CHET, I.; SPIEGEL, Y. Accumulation of lectins in cereal roots invaded by cereal cyst nematode *Heterodera avenae*. **Physiol Mol Plant Pathol.** v. 51, n., p. 333-345, 1997.

OLIVEIRA, C.C.; OLIVEIRA, S.M.; GODOY, L.M.F.; GABARDO, J.; BUCHI, D.F. Canova, a Brazilian medical formulation, alters oxidative metabolism of mice macrophages. **J infect.** v. 52, n., p. 420-432, 2006.

OLIVEIRA, J. T. A.; VASCONCELOS, I. M.; GONDIM, M. J. L.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; SANTOS, C. F.; MOREIRA, L. I. M. Canavalia brasiliensis seeds. Protein quality and nutritional implications of dietary lectin. **J Sci Food Agric** v. 64, n., p. 417-424., 1994.

OLSON, T. S.; SINGBARTL, K.; LEY, K. L-selectin is required for fMLP- but not C5a-induced margination of neutrophils in pulmonary circulation. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 282, n. 4, p. R1245-1252, 2002.

OTTA, Y.; AMANO, K.; NISHIYAMA, K.; ANDO, A.; OGAWA, S.; NAGATA, Y. Purification and properties of a lectin from ascomycete mushroom, *Ciborinia camelliae*. **Phytochemistry.** v. 60, n. 2, p. 103-107, 2002.

PAHLAVANI, M. A. T. Cell signaling: effect of age. **Front Biosci.** v. 3, n., p. 125–135, 1998.

PANCHAK, L. V.; ANTONIUK, V. O. [Purification of lectin from fruiting bodies of *Lactarius rufus* (Scop.: Fr.)Fr. and its carbohydrate specificity]. **Ukr Biokhim Zh.** v. 79, n. 2, p. 123-128, 2007.

PARHAM, P. O. Sistema Imune, Artmed Editora. v., n., p., 2001.

PATRICK, H. K.; NGAI; NG, T. B. A mushroom (*Ganoderma capense*) lectin with spectacular thermostability, potent mitogenic activity on splenocytes, and antiproliferative activity toward tumor cells. **Biochem Biophys Res Commun.** . v. 314, n., p. 988–993, 2003.

PEAKMAN, M.; VERGANI, D. **Imunologia básica e clínica.** Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1999.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. The role of lectins in plant defence. **Histochem J.** v. 27, n. 4, p. 253-271, 1995.

POHLEVEN, J.; OBERMAJER, N.; SABOTIC, J.; ANZLOVAR, S.; SEPCIC, K.; KOS, J.; KRALJ, B.; STRUKELJ, B.; BRZIN, J. Purification, characterization and cloning of a ricin B-like lectin from mushroom *Clitocybe nebularis* with antiproliferative activity against human leukemic T cells. **Biochim Biophys Acta.** v. 1790, n. 3, p. 173-181, 2009.

PRESANT, C. A.; KORNFELD, S. Characterization of the cell surface receptor for the *Agaricus bisporus* hemagglutinin. **J Biol Chem.** v. 247, n. 21, p. 6937-6945, 1972.

QUEIROZ, A. F.; MOURA, R. M.; RIBEIRO, J. K.; LYRA, I. L.; CUNHA, D. C.; SANTOS, E. A.; DE-SALES, M. P. Pro-inflammatory effect in mice of CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**. v. 147, n. 2, p. 216-221, 2008.

RAWLINGSON, A.; SHENDI, K.; GREENACRE, S. A.; ENGLAND, T. G.; JENNER, A. M.; POSTON, R. N.; HALLIWELL, B.; BRAIN, S. D. Functional significance of inducible nitric oxide synthase induction and protein nitration in the thermally injured cutaneous microvasculature. **Am J Pathol**. v. 162, n. 4, p. 1373-1380, 2003.

RIPOLL, C.; FAVERY, B.; LECOMTE, P.; VAN DAMME, E.; PEUMANS, W.; ABAD, P.; JOUANIN, L. Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. **Plant Sci**. v. 164, n., p. 517-523, 2003.

RODRIGUES, M. R.; RODRIGUEZ, D.; RUSSO, M.; CAMPA, A. Macrophage activation includes high intracellular myeloperoxidase activity. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 292, n. 4, p. 869-873, 2002.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. *Imunologia*. **Editora Manole Ltda., São Paulo**. v., n., p., 1999.

ROSENZWEIG, W. D.; ACKROYD, D. Binding characteristics of lectins involved in the trapping of nematodes by fungi. **Appl Environ Microbiol**. v. 46, n. 5, p. 1093-1096, 1983.

ROY, F.; BOYE, J. I.; SIMPSON, B. K. Bioactive proteins and peptides in pulse crops: Pea, chickpea and lentil. **Food Research International**. v. n 43, n., p. 432-442, 2010.

RUDIGER, H. Plant lectins - more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. **Acta Anat (Basel)**. v. 161, n. 1-4, p. 130-152, 1998.

SAGE, H. J.; CONNETT, S. L. Studies on a hemagglutinin from the meadow mushroom. II. Purification, composition, and structure of *Agaricus campestris* hemagglutinin. **J Biol Chem**. v. 244, n. 17, p. 4713-4719, 1969.

SALVEMINI, D.; WANG, Z. Q.; WYATT, P. S.; BOURDON, D. M.; MARINO, M. H.; MANNING, P. T.; CURRIE, M. G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **Br J Pharmacol**. v. 118, n. 4, p. 829-838, 1996.

SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J. A galactose-specific lectin from the red marine alga *Ptilota filicina*. **Phytochemistry**. v. 48, n. 5, p. 765-769, 1998.

SANTOS-DE-OLIVEIRA, R.; DIAS-BARUFFI, M.; THOMAZ, S. M.; BELTRAMINI, L. M.; ROQUE-BARREIRA, M. C. A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. **J Immunol.** v. 153, n. 4, p. 1798-1807, 1994.

SCHAUER, R. Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. **Adv Carbohydr Chem Biochem.** v. 40, n., p. 131-234, 1982.

SCHNEBLI, H. P.; ROEDER, C.; TARCSAY, L. Reaction of lectins with human erythrocytes. III. Surface charge density and agglutination. **Exp Cell Res.** v. 98, n. 2, p. 273-276, 1976.

SCHOEDON, G.; SCHNEEMANN, M.; WALTER, R.; BLAU, N.; HOFER, S.; SCHAFFNER, A. Nitric oxide and infection: another view. **Clin Infect Dis.** v. 21 Suppl 2, n., p. S152-157, 1995.

SEADI. Princípios Básicos de Imunologia. **1ª ed., Editora da Ulbra, Canoas.** v., n., p., 1998.

SERKE, S.; HUHN, D. Effects of various recombinant human hemopoietic growth factors (rhEpo, rhG-CSF, rhGM-CSF, rhIL-3) on the growth of peripheral blood progenitor cells (BFU-E, CFU-GM). **Blut.** v. 61, n. 1, p. 25-29, 1990.

SFORCIN, J. M. Propolis and the immune system: a review. **J Ethnopharmacol.** v. 113, n. 1, p. 1-14, 2007.

SINGH, J.; SINGH, J.; KAMBOJ, S. S. A novel mitogenic and antiproliferative lectin from a wild cobra lily, *Arisaema flavum*. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 318, n. 4, p. 1057-1065, 2004.

SMITH, J. E.; ROWAN, N. J.; SULLIVAN, R.. Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. **Biotechnol Lett** v. 24, n., p. 1839-1845, 2002.

SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Anal Biochem.** v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.

SODHI, A.; BISWAS, S. K. fMLP-induced in vitro nitric oxide production and its regulation in murine peritoneal macrophages. **J Leukoc Biol.** v. 71, n. 2, p. 262-270, 2002.

SON, C. G.; SHIN, J. W.; CHO, J. H.; CHO, C. K.; YUN, C. H.; CHUNG, W.; HAN, S. H. Macrophage activation and nitric oxide production by water soluble components of *Herichium erinaceum*. **Int Immunopharmacol.** v. 6, n. 8, p. 1363-1369, 2006.

STILLMARK, H. U. Ricin, ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen. **Inaug Diss.** v., n., p., 1888.

STITES, D. P.; TERR, A. I. *Imunologia*. Editora Prentice/Hall do Brasil Ltda, Rio de Janeiro. v., n., p., 1992.

STOIKA, R.; KASHCHAK, N.; LUTSIK-KORDOVSKY, M.; BOYKO, M.; TSYRULNYK, A. In vitro response of phagocytic cells to immunomodulating agents. **Med Sci Monit.** v. 7, n. 4, p. 652-658, 2001.

SUEYOSHI, S.; TSUJI, T.; OSAWA, T. Purification and characterization of four isolectins of mushroom (*Agaricus bisporus*). **Biol Chem Hoppe Seyler.** v. 366, n. 3, p. 213-221, 1985.

SUN, H.; ZHAO, C. G.; TONG, X.; QI, Y. P. A lectin with mycelia differentiation and antiphytovirus activities from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. **J Biochem Mol Biol.** v. 36, n. 2, p. 214-222, 2003.

TANAKA, S.; KO, K.; KINO, K.; TSUCHIYA, K.; YAMASHITA, A.; MURASUGI, A.; SAKUMA, S.; TSUNOO, H. Complete amino acid sequence of an immunomodulatory protein, ling zhi-8 (LZ-8). An immunomodulator from a fungus, *Ganoderma lucidum*, having similarity to immunoglobulin variable regions. **J Biol Chem.** v. 264, n. 28, p. 16372-16377, 1989.

TEDDER, T. F.; STEEBER, D. A.; CHEN, A.; ENGEL, P. The selectins: vascular adhesion molecules. **Faseb J.** v. 9, n. 10, p. 866-873, 1995.

THAKUR, A.; RANA, M.; LAKHANPAL, T. N.; AHMAD, A.; KHAN, M. I. Purification and characterization of lectin from fruiting body of *Ganoderma lucidum*: lectin from *Ganoderma lucidum*. **Biochim Biophys Acta.** v. 1770, n. 9, p. 1404-1412, 2007.

TOMIOKA, H.; SAITO, H. Comparison of wheat germ agglutinin- and phorbol myristate acetate-mediated triggering for macrophage H₂O₂ release: susceptibilities to various macrophage inhibitors. **Microbiol Immunol.** v. 31, n. 3, p. 211-221, 1987.

TZIANABOS, A. O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. **Clin Microbiol Rev.** v. 13, n. 4, p. 523-533, 2000.

VENKATA-REDDY, M.; GANGADHARAM, P. R. J. Heat shock treatment of macrophages causes increased released superoxide anion. **Infect. Immunol.** v. 60, n., p. p. 2386-2390, 1992.

VIDARI, G.; VITA-FINZI, P.; ZANOCCHI, A. M.; NOY, G. P. A bioactive tetraprenylphenol from *Lactarius lignyotus*. **J Nat Prod.** v. 58, n. 6, p. 893-896, 1995.

WANG, H.; GAO, J.; NG, T. B. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 275, n. 3, p. 810-816, 2000.

WANG, H.; NG, T. B. First report of an arabinose-specific fungal lectin. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 337, n. 2, p. 621-625, 2005.

WANG, H.; NG, T. B.; LIU, Q. Isolation of a new heterodimeric lectin with mitogenic activity from fruiting bodies of the mushroom *Agrocybe cylindracea*. **Life Sci.** v. 70, n. 8, p. 877-885, 2002.

WANG, H. X.; LIU, W. K.; NG, T. B.; OOI, V. E.; CHANG, S. T. The immunomodulatory and antitumor activities of lectins from the mushroom *Tricholoma mongolicum*. **Immunopharmacology.** v. 31, n. 2-3, p. 205-211, 1996.

WANG, H. X.; NG, T. B.; LIU, W. K.; OOI, V. E.; CHANG, S. T. Isolation and characterization of two distinct lectins with antiproliferative activity from the cultured mycelium of the edible mushroom *Tricholoma mongolicum*. **Int J Pept Protein Res.** v. 46, n. 6, p. 508-513, 1995.

WANG, H. X.; NG, T. B.; OOI, V. E. Lectin activity in fruiting bodies of the edible mushroom *Tricholoma mongolicum*. **Biochem Mol Biol Int.** v. 44, n. 1, p. 135-141, 1998.

WANG, S. Y.; HSU, M. L.; HSU, H. C.; TZENG, C. H.; LEE, S. S.; SHIAO, M. S.; HO, C. K. The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes. **Int J Cancer.** v. 70, n. 6, p. 699-705, 1997.

WASSER, S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 60, n. 3, p. 258-274, 2002.

WASSER, I. M.; HUANG, H. W.; MOENNE-LOCCOZ, P.; KARLIN, K. D. Heme/non-heme diiron(II) complexes and O₂, CO, and NO adducts as reduced and substrate-bound models for the active site of bacterial nitric oxide reductase. **J Am Chem Soc.** v. 127, n. 10, p. 3310-3320, 2005.

WONG, J. H.; NG, T. B. Isolation and characterization of a glucose/mannose-specific lectin with stimulatory effect on nitric oxide production by macrophages from the emperor banana. **Int J Biochem Cell Biol.** v. 38, n. 2, p. 234-243, 2006.

WOOD, K. J.; AUSTYN, J. M. Principles of cellular and molecular immunology. **Oxford University press Inc New York.** v., n., p., 1993.

XIONG, C.; LI, W.; LIU, H.; ZHANG, W.; DOU, J.; BAI, X.; DU, Y.; MA, X. A normal mucin-binding lectin from the sponge *Craniella australiensis*. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**. v. 143, n. 1, p. 9-16, 2006.

YAN, Q.; LI, Y.; JIANG, Z.; SUN, Y.; ZHU, L.; DING, Z. Antiproliferation and apoptosis of human tumor cell lines by a lectin (AMML) of *Astragalus mongolicus*. **Phytomedicine**. v. 16, n. 6-7, p. 586-593, 2009.

YAN, Q.; ZHU, L.; KUMAR, N.; JIANG, Z.; HUANG, L. Characterisation of a novel monomeric lectin (AML) from *Astragalus membranaceus* with anti-proliferative activity. **Food Chemistry**. v. 122, n. 3, p. 589-595, 2010.

ZHANG, G.; SUN, J.; WANG, H.; NG, T. B. First isolation and characterization of a novel lectin with potent antitumor activity from a *Russula* mushroom. **Phytomedicine**. v. 17, n. 10, p. 775-781, 2010.

ZHANG, G. Q.; SUN, J.; WANG, H. X.; NG, T. B. A novel lectin with antiproliferative activity from the medicinal mushroom *Pholiota adiposa*. **Acta Biochim Pol**. v. 56, n. 3, p. 415-421, 2009.

ZHAO, C.; SUN, H.; TONG, X.; QI, Y. An antitumour lectin from the edible mushroom *Agrocybe aegerita*. **Biochem J**. v. 374, n. Pt 2, p. 321-327, 2003.

ZHAO, J. K.; WANG, H. X.; NG, T. B. Purification and characterization of a novel lectin from the toxic wild mushroom *Inocybe umbrinella*. **Toxicon**. v. 53, n. 3, p. 360-366, 2009.

ZHENG, S.; LI, C.; NG, T.B.; WANG, H.X. A lectin with mitogenic activity from the edible wild mushroom *Boletus edulis*. **Proc Biochem**. v. 42, n. 12, p. 1620-1624, 2007.

ZHUANG, C.; MURATA, T.; USUI, T.; KAWAGISHI, H.; KOBAYASHI, K. Purification and characterization of a lectin from the toxic mushroom *Amanita pantherina*. **Biochim Biophys Acta**. v. 1291, n. 1, p. 40-44, 1996.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)