

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
DOUTORADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

MARY ÂNGELA ARANDA DE SOUZA

Lectina de *Bothrops leucurus*: avaliação do efeito leishmanicida e correlação com a modulação da resposta imune em macrófagos peritoneais

Recife

2018

Mary Ângela Aranda de Souza

Lectina de *Bothrops leucurus*: avaliação do efeito leishmanicida e correlação com a modulação da resposta imune em macrófagos peritoneais

Tese apresentada ao ao curso de doutorado em Biociências e Biotecnologia do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz como requisito para a obtenção do grau de doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo

Coorientadora: Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Recife

2018

Catálogo na fonte: Biblioteca do Instituto Aggeu Magalhães

- S7291 Souza, Mary Ângela Aranda de.
Lectina de *Bothrops leucurus*: avaliação do efeito leishmanicida e correlação com a modulação da resposta imune em macrófagos peritoneais / Mary Ângela Aranda de Souza. - Recife: [s.n.], 2018.
158 p. : il., tab. ; 30 cm
- Tese (doutorado em saúde pública) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2018.
Orientador: Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo; coorientador: Maria Tereza dos Santos Correia.
1. Lectinas. 2. Leishmania. 3. Macrófagos. 4. Fibras. 5. Imunomodulação. I. Figueiredo, Regina Celia Bressan Queiroz de. II. Correia, Maria Tereza dos Santos. III. Título.

Mary Ângela Aranda de Souza

Lectina de *Bothrops leucurus*: avaliação do efeito leishmanicida e correlação com a modulação da resposta imune em macrófagos peritoneais

Tese apresentada ao ao curso de doutorado em Biociências e Biotecnologia do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz como requisito para a obtenção do grau de doutor em Ciências.

Data de aprovação: 19 / 09 / 2018

Banca examinadora

Dra. Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dra. Valéria Pereira Hernandes
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dra. Sheila Andrade de Oliveira
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Profa. Dra. Márcia Regina Piuvezam
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

À todos que direta ou indiretamente participaram desta conquista.

AGRADECIMENTOS

Todos os dias são páginas em branco prontas para serem preenchidas com felicidade. Agradeço a Deus, que me deu o dom da vida, e que me dá forças para vencer as pequenas e grandes batalhas de cada dia. Portanto, é para Ele o agradecimento por tudo que já consegui escrever, e peço que continue me dando sabedoria para fazer as melhores escolhas na criação da minha história.

Aos meus pais, Francineide e Domingo, pelo que fui, pelo que sou e pelo que ainda serei, a eles tudo devo.

Ao meu amor, Renan Soares, que Deus carinhosamente trouxe de volta para minha vida no tempo certo. A você eu agradeço por todo apoio, força e paciência, pela honra de dividir comigo a sua vida e é por isso que eu divido esta conquista com você.

A Dra. Regina Bressan, Rê, por me receber no Laboratório de Biologia Celular de Patógenos, por toda confiança e amizade em mim depositadas.

Ao Dr. Antonio Neves, pelas sugestões e críticas construtivas, além dos bons papos no laboratório.

A coorientadora Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia por toda a atenção, amizade e confiança ao longo de todos esses anos desde a Iniciação científica.

A Dra. Cynarha Cardoso, por me apresentar ao laboratório, pela amizade e apoio que contribuíram para realização deste trabalho.

A Keicyanne Fernanda e Andrezza Borges, pela amizade, companheirismo e cumplicidade em todos os momentos.

A Danilo Cavalcanti, pela amizade pessoal e profissional, além da companhia tão divertida de todos os dias.

A Rafaela Cavalcanti, minha IC e amiga tão querida, pelo apoio, companheirismo, dedicação e, acima de tudo, aprendizado que tivemos juntas.

Aos amigos André Aires e Renata Souza que me apoiaram e estimularam desde a seleção de doutorado, pelo apoio e pelo carinho tanto no lado pessoal como na minha vida acadêmica.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Celular de Patógenos: Ana Carla, Vinícius, Carina, Rosy, Vanderlan, Karina, Taciana, Larissa, Rayana, Suênia, Tainá, Cinthia e Víctor, pela companhia diária.

Aos colegas do Centre de Recherche (Université Laval): Ana Maria, Christelle Morelle, Camila, Arijt, Mansi, Marine, ao Dr. Philippe Leprohon e Dr. Marc Oulelette, por todo apoio no período do Doutorado Sanduíche em Quebec, Canada.

A tantas outras pessoas que participaram direta ou indiretamente desta conquista, os meus mais profundos agradecimentos!

“Qualquer caminho é apenas um caminho e não constitui insulto algum – para si mesmo ou para os outros – abandoná-lo quando assim ordena seu coração. Olhe cada caminho com cuidado e atenção. Tente-o quantas vezes julgar necessárias. Então, faça a si mesmo e apenas a si mesmo uma pergunta: possui esse caminho um coração? Em caso afirmativo, o caminho é bom.”

Carlos Castañeda

SOUZA, Mary Angela Aranda de. **Lectina de *Bothrops leucurus***: avaliação do efeito leishmanicida e correlação com a modulação da resposta imune em macrófagos peritoneais. 2018. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

RESUMO

Leishmania amazonensis, *L. braziliensis* e *L. infantum* são os principais agentes causadores das leishmanioses no Brasil. As drogas utilizadas na terapêutica das leishmanioses induzem diversos efeitos e não existe uma vacina efetiva. As lectinas são proteínas ligantes de carboidratos que apresentam atividade imunomoduladora. O potencial uso das lectinas como agente quimioterápico contra *Leishmania* spp. ainda é incipiente. Neste trabalho, investigamos o potencial leishmanicida e imunomodulador da lectina obtida da peçonha da serpente *Bothrops leucurus* (BLL). Os resultados demonstraram que BLL inibiu o crescimento e viabilidade de formas promastigotas de *Leishmania* spp., através de um mecanismo dependente de galactose e cálcio. A incubação de BLL com células infectadas diminuiu a sobrevivência e causou alterações ultraestruturais das amastigotas sem aparentes danos às células hospedeiras. BLL induziu um aumento na secreção das citocinas pró-inflamatórias em macrófagos infectados. Assim, o mecanismo de ação desta lectina em ambas as espécies converge na produção de NO e morte do parasito. Em *L. infantum*, o tratamento com BLL levou a diminuição do crescimento celular do parasito e dano mitocondrial. A análise por sequenciamento de nova geração destacou o papel das Tryparedoxinas no mecanismo de resistência ao tratamento com BLL. Por outro lado, sob condições específicas, lectinas podem formar agregados e/ou oligômeros. O padrão de agregação de BLL em meio de cultivo foi investigado para avaliar o efeito sobre macrófagos. Concluiu-se que fibras semelhantes a amiloides derivadas de BLL são eficientemente fagocitadas por macrófagos, com consequente liberação de citocinas pró-inflamatórias. Desta forma, BLL e/ou seus agregados possuem ação leishmanicida e imunomoduladora em macrófagos infectados por *Leishmania* spp. em um mecanismo dependente da produção de NO e citocinas pró-inflamatórias.

Palavras-chave: Lectinas. Leishmania. Macrófagos. Fibras. Imunomodulação

SOUZA, Mary Angela Aranda de. **Lectin from *Bothrops leucurus***: Evaluation of leishmanicidal effects and correlation with the modulation of immune response in peritoneal macrophages. 2018. Thesis (Doctorate degree in Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

ABSTRACT

Leishmania amazonensis, *L. braziliensis* and *L. infantum* are the main causative agents of leishmaniasis in Brazil. Drugs used in the therapy of leishmaniasis induce several effects and there is no effective vaccine. Lectins, are carbohydrate binding proteins that have immunomodulatory activity. The potential use of lectins as a chemo-/ immunotherapeutic agent against *Leishmania* spp. is still incipient. In this work, we have investigated the leishmanicidal and immunomodulatory potential of a lectin from *Bothrops leucurus* venom (BLL). The results demonstrated that BLL inhibited the growth and viability of promastigote forms of *Leishmania* spp., through a mechanism dependent on galactose and calcium. Incubation of BLL with infected cells decreased the survival of amastigotes causing ultrastructural changes on this form with no apparent damage to host cells. BLL induced an increase in the secretion of proinflammatory cytokines in infected macrophages. The mechanism of action of this lectin in both species converges to the production of NO, leading to the parasite death. In *L. infantum*, BLL treatment led to decreased of parasite growth and mitochondrial damage. The new generation sequencing analysis highlighted the role of trypanothione in the mechanism of resistance to BLL treatment. On the other hand, under specific conditions, lectins form aggregates and/or oligomers. We investigated the aggregation behavior of BLL in culture medium and its effect on macrophage activity. BLL-derived amyloid-like fibers are efficiently phagocytosed by macrophages, with the release of proinflammatory cytokines. Overall, BLL and/or its aggregates have leishmanicidal and immunomodulatory action on macrophages infected with *Leishmania* spp. in a mechanism dependent on NO production and proinflammatory cytokines.

Keywords: Lectins. *Leishmania*. Macrophage. Fibrils. Immunomodulation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Endemicidade da leishmaniose cutânea no mundo, 2015	17
Figura 2- Endemicidade da leishmaniose visceral no mundo, 2015	18
Figura 3- Representação esquemática da forma amastigota e promastigota de <i>Leishmania</i> sp.	20
Figura 4- Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> , o agente causador da leishmaniose	21
Figura 5- Papel da IL-1 β e ativação de inflamassomo como protetor ou indutor de patogênese na leishmaniose	24
Figura 6- Representação esquemática da estrutura secundária de uma lectina do tipo-C complexada com seu carboidrato ligante específico	28
Quadro 1- Categorias de classificação de lectinas	29
Figura 7- Estrutura secundária da BiL, lectina da peçonha de <i>Bothrops insularis</i> , complexada com o Ca ²⁺ (esfera cinza) e a galactose. A ponte dissulfeto está em branco	29
Figura 8- Esquema simplificado do processo de agregação amiloide	32
Figura 9- Efeito de BLL sobre o crescimento de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. braziliensis</i>	46
Figura 10- Efeito de Galactose e EGTA sobre a atividade leishmanicida e sobre o potencial de membrana mitocondrial após tratamento com BLL	48
Figura 11- Efeito de BLL sobre amastigotas intracelulares	49
Figura 12- Efeito do Cálcio e Galactose sobre a atividade de BLL contra formas amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. braziliensis</i>	51
Figura 13- Efeito de BLL sobre a ultraestrutura de amastigotas intracelulares observadas por microscopia eletrônica de transmissão	52
Figura 14- Efeito de BLL na produção de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias	54
Figura 15- Efeito de BLL sobre a produção de espécies reativas de oxigênio citosólicas e potencial de membrana mitocondrial em formas promastigotas de <i>L. infantum</i>	56
Figura 16- Efeito de BLL sobre o potencial de membrana mitocondrial de formas promastigotas de <i>L. infantum</i>	58

Figura 17- Efeito de BLL sobre a ultraestrutura de <i>L. infantum</i>	59
Figura 18- Identificação por Cos-Seq dos <i>loci</i> relacionados com a resistência ao tratamento com BLL	62
Figura 19- Análise da ultraestrutura de macrófagos tratados com BLL	64
Figura 20- Caracterização Bioquímica e Morfológica das fibras amiloides derivadas de BLL	65
Figura 21- Presença de fibras amiloide- <i>like</i> no interior de macrófagos	67
Figura 22- Fibras amiloide- <i>like</i> derivadas de BLL são internalizadas por fagocitose	68
Figura 23- Imunocitoquímica de estruturas amiloide- <i>like</i> derivados BLL em macrófagos peritonenais	69
Figura 24- Efeito das fibras amiloide- <i>like</i> derivadas de BLL sobre a secreção de citocinas em macrófagos	70
Figura 25- Modelo esquemático do mecanismo de ação de BLL sobre macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> e <i>L. braziliensis</i>	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Avaliação do efeito antileishmania e citotóxico da lectina de <i>Bothrops leucurus</i>	47
Tabela 2- Avaliação do efeito antileishmania e citotóxico da lectina de <i>Bothrops leucurus</i>	55
Tabela 3- Análise por Cos-Seq dos <i>loci</i> genômicos enriquecidos	61

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Leishmania	17
1.1.1 Leishmanioses	17
1.1.2 Formas Clínicas	18
1.1.3 Agente Etiológico	19
1.1.4 Ciclo de vida da <i>Leishmania sp.</i>	20
1.1.5 Imunologia da Leishmaniose.....	21
1.1.6 Quimioterapia e Prospecção de Novos Alvos Terapêuticos contra <i>Leishmaniose</i>	23
1.2. Lectinas	25
1.2.1 Particularidades de lectinas	26
1.2.2 Lectinas de animais	27
1.2.3 Lectinas Tipo C	29
1.2.4 Lectina de <i>Bothrops leucurus</i> (BLL)	30
1.2.5 Tripanossomatídeos e as lectinas	30
1.2.6 As Lectinas e a Agregação Amilóide	31
2 JUSTIFICATIVA	34
3 OBJETIVOS	35
3.1 Objetivo Geral	35
3.2 Objetivos Específicos	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Isolamento, purificação e caracterização da lectina	36
4.2 Cultura de Parasitos	36
4.3 Avaliação do efeito sobre formas promastigotas e amastigotas de <i>L.</i> <i>amazonensis</i> e <i>L. braziliensis</i>	36
4.3.1 Efeito <i>in vitro</i> sobre o crescimento e viabilidade de formas promastigotas	36
4.3.2 Avaliação do efeito de BLL sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	37
4.3.3 Citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C.....	37
4.3.4 Efeito <i>in vitro</i> sobre formas amastigotas intracelulares	38
4.3.5 Avaliação do papel imunomodulador de BLL	38

4.4 Efeito de BLL sobre diferentes cepas de <i>L. infantum</i> e identificação do mecanismo de resistência ao tratamento	39
4.4.1 Efeito de BLL sobre o crescimento de <i>L. infantum</i>	39
4.4.2 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio no citoplasma após tratamento com BLL	39
4.4.3 Avaliação do efeito de BLL sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	39
4.4.4 Análise do $\Delta\Psi_m$ por microscopia confocal	40
4.4.5 Indução de resistência ao tratamento com BLL em parasitos da cepa 263	40
4.4.6 Extração e Purificação dos cosmídeos para sequenciamento	41
4.4.7 Alinhamento e montagem das sequências	41
4.3.8 Análise da amplificação dos genes de resistência	41
4.5 Avaliação do efeito de BLL sobre macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C	42
4.5.1 Citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C	42
4.5.2 Ensaio de Cinética de Agregação amiloide	42
4.5.3 Marcação com Thioflavina T e Vermelho do Congo	42
4.5.4 Contrastação negativa	43
4.5.5 Marcação de depósitos amiloides intracelulares com Vermelho do Congo	43
4.5.6 Marcação de depósitos amiloides intracelulares com Thioflavina S	43
4.5.7 Imunocitoquímica para microscopia eletrônica de transmissão	44
4.5.8 Avaliação do efeito imunomodulador de BLL sobre macrófagos peritoneais	44
4.5 Estudo ultraestrutural	45
4.6 Análise Estatística	45
4.7 Comitê de ética em pesquisa	45
5 RESULTADOS	46
5.1 Avaliação do efeito sobre formas promastigotas e amastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. braziliensis</i>	46
5.1.1 O tratamento com BLL foi mais seletiva para formas promastigotas do que para células do hospedeiro	46
5.1.2 A atividade de BLL sobre formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. braziliensis</i> é dependente de galactose e íons de Cálcio	47

5.1.3 <i>BLL promove diminuição do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. braziliensis</i></i>	48
5.1.4 <i>BLL afetou a sobrevivência de amastigotas intracelulares</i>	48
5.1.5 <i>Macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> e <i>L. braziliensis</i> respondem diferentemente a presença de galactose e EGTA durante o tratamento com BLL</i>	50
5.1.6 <i>Efeito de BLL sobre a ultraestrutura de amastigotas intracelulares</i>	51
5.1.7 <i>O tratamento com BLL modula diferencialmente a secreção de citocinas e produção de NO em macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> e <i>L. braziliensis</i> ..</i>	53
5.2 Efeito de BLL sobre diferentes cepas de <i>L. infantum</i> e identificação do mecanismo de resistência ao tratamento	55
5.2.1 <i>BLL inibe o crescimento de formas promastigotas de <i>L. infantum</i> e não é citotóxica as células da linhagem Vero</i>	55
5.2.2 <i>BLL promove aumento da produção de Espécies Reativas de Oxigênio e diminuição do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em formas promastigotas de <i>L. infantum</i></i>	56
5.2.3 <i>A incubação com BLL está relacionada a alteração no potencial de membrana da mitocôndria em promastigotas de <i>L. infantum</i></i>	56
5.2.4 <i>Efeito de BLL sobre a ultraestrutura de promastigotas de <i>L. infantum</i></i>	59
5.2.5 <i>Indução de resistência ao tratamento com BLL em parasitos da cepa 263</i>	60
5.2.6 <i>Determinação dos genes de resistência ao tratamento com BLL</i>	60
5.3 Avaliação do efeito de BLL sobre macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C	63
5.3.1 <i>Alterações ultraestruturais em macrófagos peritoneais tratados com BLL</i>	63
5.3.2 <i>Formação de agregados amiloide-like a partir da incubação de BLL em condições de cultivo celular.....</i>	65
5.3.3 <i>Fibras amiloide-like derivadas de BLL se acumulam no interior de macrófagos</i>	66
5.3.4 <i>Fagocitose de amiloides-like derivados de BLL e a modulação da resposta imune em macrófagos</i>	68
6 DISCUSSÃO	71
7 CONCLUSÕES	82
REFERÊNCIAS	84

APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO	96
INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES	
APÊNDICE B - ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO TOXICON.....	105
APÊNDICE C- PCRAMOLL AND RCRAMOLL LECTINS INDUCE CELL	
DEATH IN HUMAN PROSTATE ADENOCARCINOMA (PC-3) CELLS BY	
IMPAIRMENT OF MITOCHONDRIAL HOMEOSTASIS	130
APÊNDICE D- LECTIN-CARBOHYDRATE INTERACTIONS:	
IMPLICATIONS FOR THE DEVELOPMENT OF NEW ANTICANCER	
AGENTS	137
ANEXO A- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	151

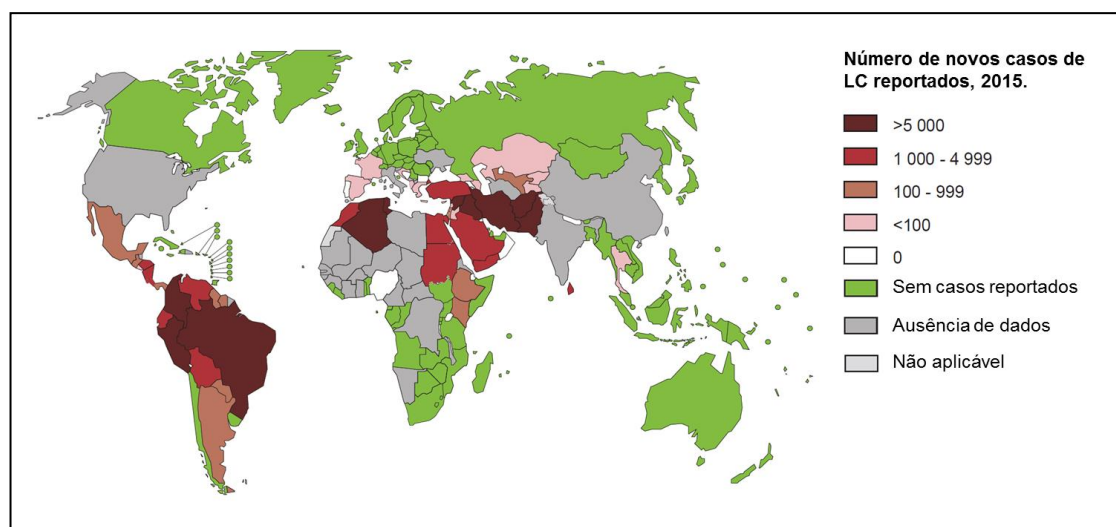
1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmania

1.1.1 Leishmanioses

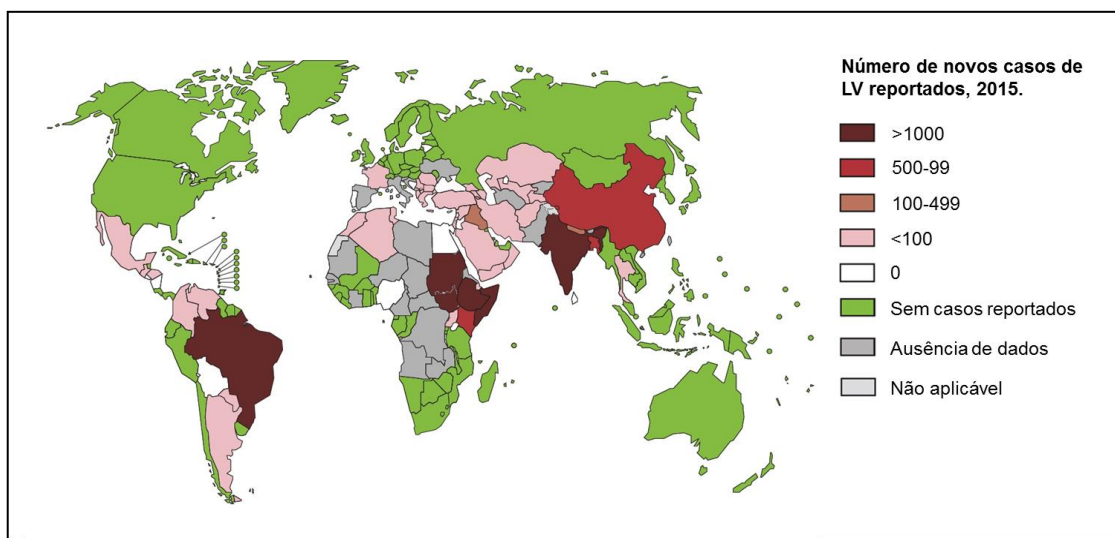
As leishmanioses estão presentes em 88 países, com cerca de 12 milhões de pessoas infectadas e 350 milhões de pessoas sob o risco de infecção. Causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, constituem um grupo de doenças de grande impacto na Saúde Pública com incidência estimada em 700.000 a 1 milhão de novos casos, com 20.000 a 30.000 casos fatais ocorrendo anualmente (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015) (**Figura 1 e 2**). Estes protozoários caracterizam-se por serem parasitas principalmente de macrófagos e células dendríticas, levando a manifestações clínicas que dependem tanto da resposta imune do hospedeiro quanto da espécie infectante. Consideradas doenças de importância no contexto da saúde pública, as leishmanioses estão incluídas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) entre as seis doenças endêmicas de maior relevância no mundo.

Figura 1 - Endemicidade da leishmaniose cutânea (LC) no mundo, 2015.



Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2017.

Figura 2 - Endemicidade da leishmaniose visceral (LV) no mundo, 2015.



Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2017.

1.1.2 Formas Clínicas

A forma mais comum de leishmaniose é a leishmaniose cutânea (LC), caracterizada por apresentar diferentes graus de severidade, de aparência clínica e de tempo de cura (AKHOUNDI et al., 2016; REITHINGER et al., 2007). O aspecto desfigurante que estas lesões podem assumir ao longo do curso da doença tem contribuído para segregação social e econômica dos indivíduos afetados (DAVID; CRAFT, 2009). Em geral, as lesões causadas pela leishmaniose cutânea apresentam aspectos variados e a infecção secundária bacteriana altera este aspecto tornando-as mais inflamadas, dolorosas e purulentas (BRASIL, 2007). A LC pode ainda acontecer de diferentes formas: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose mucocutânea (LMC). Na LMC, as lesões inicialmente se apresentam na pele e, posteriormente, se disseminam até a mucosa de nariz, boca e garganta. Subsequentemente, as ulcerações na mucosa podem causar a destruição do septo nasal, lábios e palato, levando a um quadro de intensa desfiguração facial (MURRAY et al., 2005).

No Velho Mundo os principais agentes etiológicos implicados na leishmaniose cutânea são *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica*, enquanto *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* estão relacionadas com a doença no Novo Mundo (CASTELLUCCI et al., 2012; EL-ON, 2009).

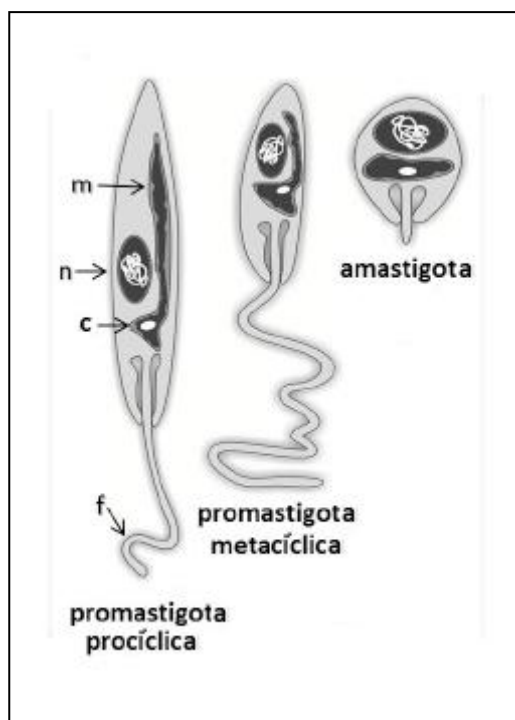
A leishmaniose visceral (LV) é considerada a mais severa forma de leishmaniose, levando a cerca de 95% de mortalidade nos casos não tratados. Os principais sintomas da LV incluem: febre irregular, perda de peso, hepatomegalia, esplenomegalia e, por vezes, hepatoesplenomegalia (AKHOUNDI et al., 2016). A LV é essencialmente causada por *L. donovani* (na Ásia e África) e *L. infantum* (no sul da Europa, bem como na América do Sul, onde é usualmente referida como *L. chagasi*).

Atualmente pode-se dizer que, no Brasil, a leishmaniose apresenta três padrões epidemiológicos característicos: a) Silvestre - a transmissão ocorre em área de vegetação primária sendo fundamentalmente uma zoonose de animais silvestres, que pode acometer o ser humano quando este entra em contato com o ambiente silvestre, onde esteja ocorrendo enzootia; b) Ocupacional e lazer - a transmissão está associada à exploração desordenada da floresta por derrubada de matas para construção de estradas, usinas hidrelétricas, instalação de povoados, extração de madeira, desenvolvimento de atividades agropecuárias, de treinamentos militares e ecoturismo; c) Rural e periurbano em áreas de colonização – este padrão está relacionado ao processo migratório, ocupação de encostas e aglomerados em centros urbanos associados a matas secundárias ou residuais (BRASIL, 2007).

1.1.3 Agente Etiológico

Durante o seu ciclo de vida, os parasitas do gênero *Leishmania*, apresentam dois estágios morfológicamente distintos: a forma promastigota com motilidade flagelar presente no trato digestivo dos flebotomíneos, e a forma amastigota, não móvel, que reside no interior de macrófagos de hospedeiros vertebrados (**Figura 2**). As promastigotas possuem forma alongada, com único núcleo, flagelo livre e cinetoplasto (região especializada da mitocôndria onde se localiza o DNA mitocondrial) anterior ao núcleo. O tamanho das formas promastigotas é variável, mesmo dentro de uma mesma espécie, podendo medir entre 16 – 40 x 1,5 – 3 µm (comprimento x largura) incluindo o flagelo que é sempre maior que o corpo do parasito. Estas formas multiplicam-se por divisão binária longitudinal dentro do tubo digestivo do inseto vetor. As amastigotas se multiplicam no interior dos macrófagos possuindo morfologia ovalada, com núcleo único, cinetoplasto e um flagelo que nunca excede os limites da bolsa flagelar. A forma amastigota varia de tamanho dependendo da espécie, podendo medir entre 3 – 6,5 x 1,5 – 3 µm (comprimento x largura) (SANTOS et al., 2013).

Figura 3 - Representação esquemática da forma amastigota e promastigota de *Leishmania*.



Fonte: Adaptado de Santos et al. (2013).

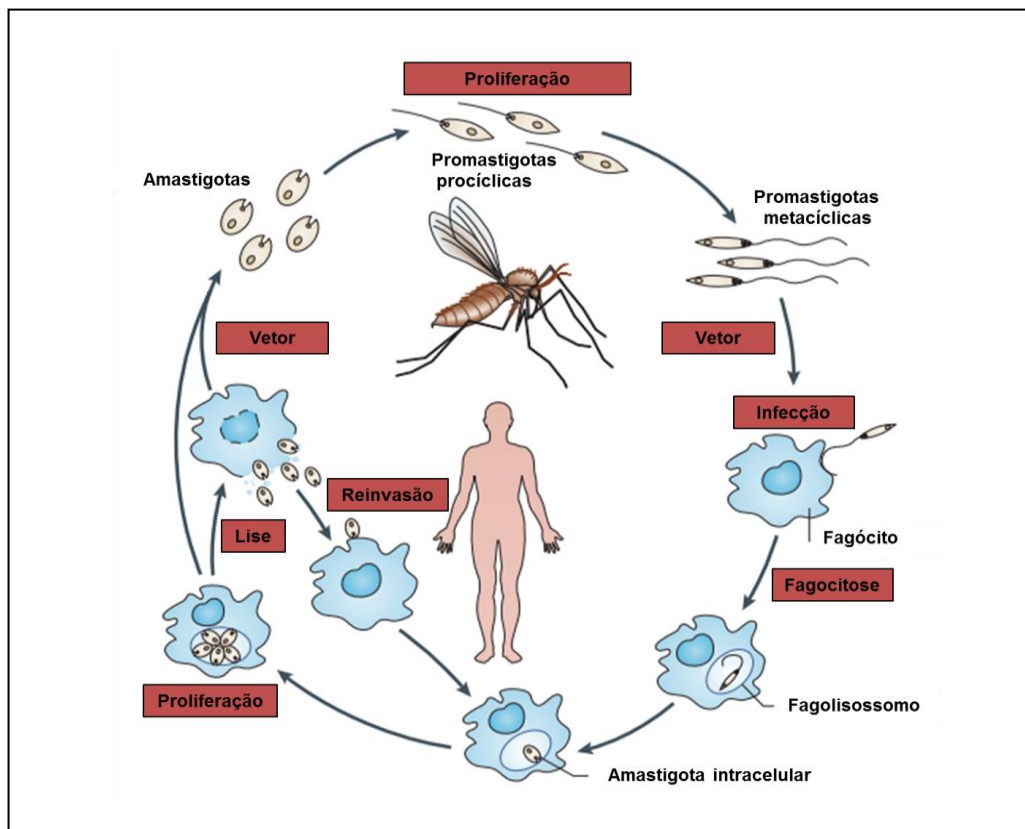
Legenda: Aspecto morfológico das formas evolutivas promastigotas (procíclica e metacíclica) evidenciando a localização do núcleo (n), flagelo (f) e cinetoplasto (c). Para formas promastigotas e amastigotas, o cinetoplasto está localizado na porção anterior ao núcleo. Todas as formas, possuem uma única mitocôndria (m) ramificada na extensão do corpo celular até o início do cinetoplasto.

1.1.4 Ciclo de vida da *Leishmania*

O ciclo biológico desse protozoário ocorre em dois estágios: dentro do aparelho digestivo e glândula salivar do inseto vetor, sob a forma promastigota, e no interior de macrófagos e células dendríticas de hospedeiros vertebrados, a forma amastigota. Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do flebotomíneo (essencialmente pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*) inocula a forma promastigota infectiva do parasita juntamente com a saliva (forma metacíclica). Inicialmente, os parasitos são capturados por células do sistema fagocítico mononuclear presentes no tecido epitelial, sendo os macrófagos os seus principais alvos (SCOTT, 2011). Em adição à fagocitose dos parasitos, macrófagos também fagocitam neutrófilos infectados em processo de apoptose. No interior dos macrófagos, as formas promastigotas estabelecem uma residência intracelular e se transformam em amastigotas. Após multiplicação, com o aumento no número de amastigotas no interior do vacúolo parasitóforo, os parasitos são liberados através de lise celular, resultando na infecção de outras células. O ciclo de vida é completado quando

outro hematófago ingere sangue infectado novamente durante o repasto sanguíneo. Dentro do vetor, formas amastigotas são convertidas em promastigotas procíclicas. Neste ponto, os parasitos se proliferam, se diferenciam em formas promastigotas infectivas e migram para as glândulas salivares do mosquito, perpetuando o ciclo de vida (KAYE; SCOTT, 2011) (Figura 4).

Figura 4 - Ciclo de vida de *Leishmania*, o agente causador da leishmaniose.



Fonte: Adaptado de Kaye e Scott (2011)

Legenda: Formas promastigotas procíclicas de *Leishmania* se diferenciam em formas infectantes metacíclicas no interior do flebotomíneo. Durante o repasto sanguíneo, o inseto regurgita os promastigotas metacíclicos, juntamente com proteofosfoglicanos com função imunomoduladora e vários componentes da saliva do inseto. Os parasitos promastigotas metacíclicos são fagocitados, estabelecem uma residência intracelular e se diferenciam em formas amastigotas. Após replicação dos amastigotas e posterior ruptura da célula hospedeira, há a liberação de amastigotas que irão infectar outras células. O ciclo de transmissão está completo quando um outro flebotomíneo é contaminado durante o repasto sanguíneo.

1.1.5. Imunologia da Leishmaniose

Vários estudos têm demonstrado que a resposta do hospedeiro contra a *Leishmania* pode ser modulada por vários fatores incluindo células do sistema imunológico como neutrófilos, células Natural Killer (NK), macrófagos, linfócitos T

CD4+ e citocinas como o interferon- γ (IFN- γ), a interleucina-12 (IL-12) e factor necrose tumoral (TNF) (BIRNBAUM et al., 2011). Neste sentido, os macrófagos são considerados fundamentais para que a infecção se estabeleça, pois são as principais células infectadas e o local de replicação dos amastigotas (JOHN; HUNTER, 2008; NYLÉN; GAUTAM, 2010). Estas células possuem potente função antimicrobiana, agem como células efetoras e juntamente com as células dendríticas, apresentam antígenos de *Leishmania*, ativando os linfócitos T (BIRNBAUM et al., 2011). No entanto, capacidade microbicida dos macrófagos pode ser superada pelos mecanismos de defesa do parasito, que consegue sobreviver e multiplicar-se num ambiente totalmente desfavorável (KAYE; SCOTT, 2011).

A incapacidade dos macrófagos em matar os parasitos e ativar outras células efetoras do sistema imune é produto da capacidade persistente do parasito em alterar várias vias de sinalização chaves. Esta rápida mudança nas vias de sinalização serve a pelo menos duas estratégias dos parasitos: a princípio, a inibição dos mecanismos de morte induzida pelos macrófagos que são disparados após a fagocitose de partículas estranhas (i.e. a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio). Além disso, a inibição da função leishmanicida que pode ser disparada em resposta a ativação dos macrófagos tanto por estímulos provenientes do parasito quanto da produção de IFN- γ , os quais levam a produção de óxido nítrico (SHIO et al., 2012).

Além dos mecanismos de evasão do parasito, o estabelecimento ou não da infecção por leishmania depende, na maioria dos casos, de duas subpopulações de células T CD4+, Th1 e Th2, e de suas citocinas associadas. (GIUDICE et al., 2012; KEDZIERSKI, 2010; OLIVEIRA et al., 2014; REIS et al., 2006). Os linfócitos T são fundamentais na resposta do hospedeiro às leishmanioses e decisivos para cura e geração de uma resposta imune protetora, ao mesmo tempo em que são responsáveis pela persistência da doença e a sua patologia (CHOI; KROPF, 2009). O padrão de resposta imune do tipo Th1 com produção de IFN- γ , TNF- α e IL-12, tem sido associado com o controle da infecção através da ativação dos macrófagos e destruição parasitária (AMEEN, 2010; ROBERTS, 2006). A citocina IFN- γ atua em sinergia com TNF- α ativando óxido nítrico sintase (iNOS ou NOS2) a produzir óxido nítrico (NO), resultando na morte intracelular do parasito e controle da doença (BOGDAN et al., 2001; NYLEEN e GAUTAM, 2010). Por outro lado, citocinas como IL-4, IL-10 e TGF- β , consideradas do tipo Th2, favorecem a multiplicação parasitária, inibindo a produção de NO por macrófagos ativados por IFN- γ (GOMES-SILVA et al., 2007). Essas citocinas também

são capazes de inibir a diferenciação dos linfócitos T para um perfil Th1 e consequente produção de IFN- γ e TNF- α (BARATTA-MASINI et al., 2007).

Adicionalmente, a fagocitose de *Leishmania* também leva à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) na tentativa de eliminação do parasito, além de causar a ativação do inflamassomo NLRP3. A pro-IL-1 β , forma inativa da citocina IL-1 β , é processada pelo inflamassomo na pele da pessoa infectada. No entanto, o fator (ou fatores) que induz (em) a produção da IL-1 β na pele permanecem desconhecidos. A ativação de IL-1 β é essencialmente acompanhada da ativação de inflamassomo e mediada pela clivagem da Caspase-1 (Figura 5). Além disso, a ativação do inflamassomo pode funcionar como sinalizador de resposta na infecção por *L. braziliensis* em humanos (NOVAIS et al., 2015).

IL-1 β é essencial na expansão de células Th1, pois promove o aumento na produção de IL-12. Além disso, IL-1 β também é capaz de induzir a ativação de NO, participando diretamente na ativação dos macrófagos e, indiretamente, promovendo a resposta do tipo Th1 e aumento na produção de IFN γ . Entretanto, em contraste com o efeito protetor, a resposta exacerbada de IL-1 β e TNF- α pode levar à produção de diversas citocinas e quimiocinas que promovem o aumento na expressão de moléculas de adesão e levam à destruição tecidual e agravamento da doença (SCOTT; NOVAIS, 2016). Estudos prévios demonstraram que animais com deficiência em componentes do inflamassomo foram mais susceptíveis à infecção (CHARMOY et al., 2016). Em camundongos infectados com *L. amazonensis*, a ativação de IL-1 β via inflamassomo parece promover a produção de NO mas o estímulo não seria suficiente para cura do animal. Desta forma, o inflamassomo pode estar relacionado com a proteção ou exacerbção da patogênese da leishmaniose (LIMA-JUNIOR et al., 2013).

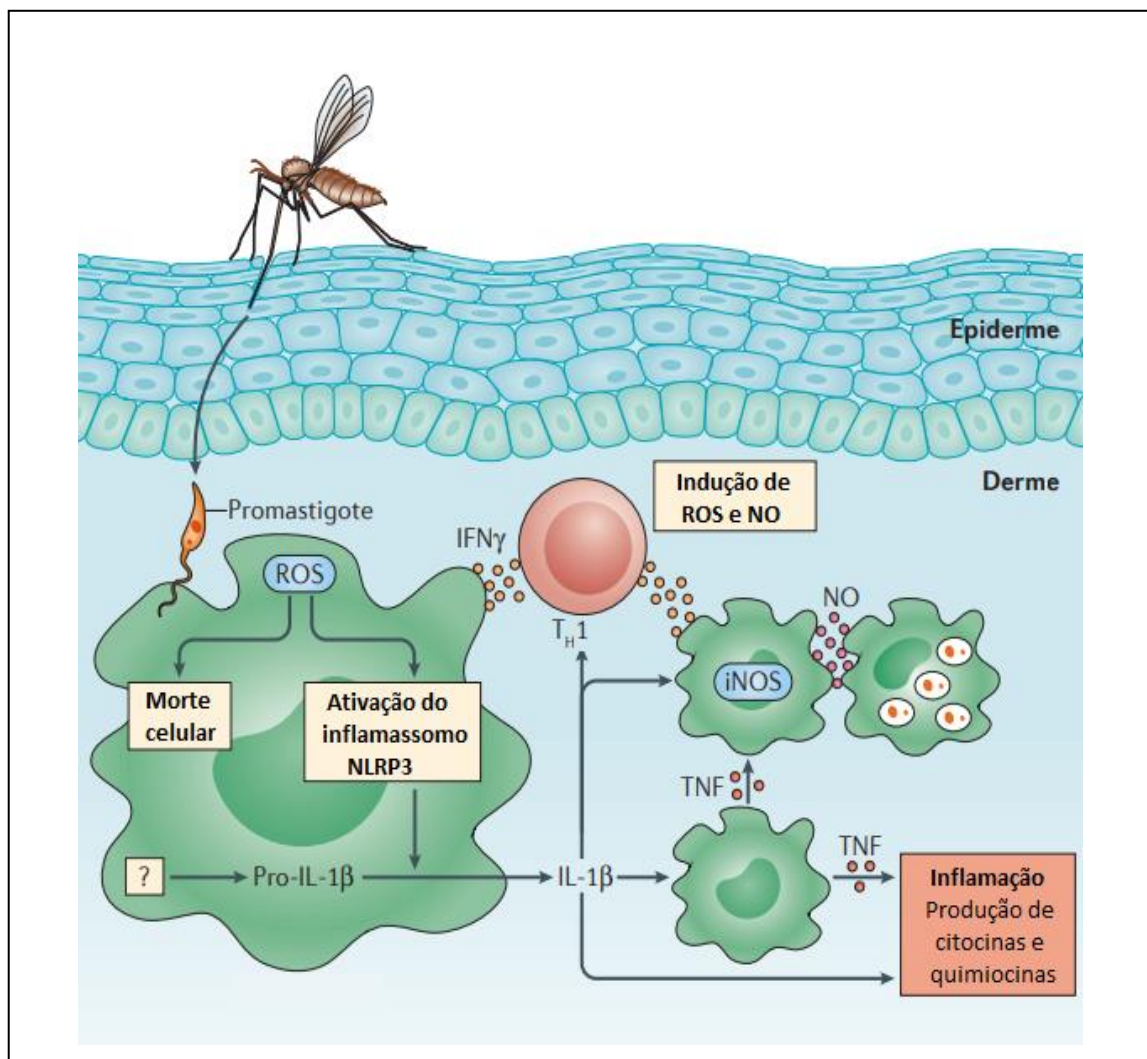
O papel do sistema imune do hospedeiro e o tipo de resposta elicitado podem explicar o insucesso de tratamento e a geração de resistência e devem ser levados em consideração no desenvolvimento racional de novas drogas (BANERJEE et al., 2011).

1.1.6 Quimioterapia e Prospecção de Novos Alvos Terapêuticos contra Leishmaniose

Independente da espécie de *Leishmania* envolvida, a terapia para leishmanioses ainda é baseada no uso de antimoniais pentavalentes, como drogas de primeira escolha. Porém os efeitos adversos, a necessidade de uma administração parenteral, regimes de

tratamento prolongados e aparecimento de resistência do parasita ao tratamento ainda se impõem como principais obstáculos à erradicação da doença, principalmente nos países subdesenvolvidos e/ou em desenvolvimento (CUNHA, 2015; GONZÁLEZ et al., 2008). Neste panorama, a procura de alternativas para o tratamento destas doenças ainda se faz necessária.

Figura 5 - Papel da IL-1 β e ativação de inflamassomo como protetor ou indutor de patogênese na leishmaniose.



Fonte: Adaptado de Scott e Novais (2016).

É consenso entre os pesquisadores que o desenvolvimento de novas drogas contra tripanosomatídeos, passa pelo conhecimento da biologia celular e de rotas metabólicas próprias do parasita, não encontradas nas células do hospedeiro, e que possam ser utilizadas como alvo seletivo contra estes parasitos. *Leishmania sp.*, como outros tripanosomatídeos, apresenta ciclo de vida complexo, envolvendo hospedeiros

vertebrados e invertebrados. Durante seu ciclo de vida, estes parasitos adaptam seu metabolismo de acordo com a disponibilidade de alimentos, ou melhor, com os substratos disponíveis (TIELENS; VAN HELLEMOND, 2009). O metabolismo energético de tripanossomatídeos apresenta características peculiares, além de um sistema enzimático e organelas bastante especializadas que permitem ao parasita se adaptar às diferentes condições do meio (FIDALGO; GILLE, 2011). Um exemplo disso está no fato de que, ao contrário da maior parte dos eucariotos onde a via glicolítica ocorre no citoplasma, nos tripanossomatídeos ela ocorre dentro de uma organela denominada glicosomo (BRINGAUD et al., 2006), a qual é exclusiva destes protozoários, constituindo assim um alvo interessante para drogas. Por outro lado, o Ca^{2+} , é um importante íon atuando como segundo mensageiro essencial em eucariotos, incluindo os protozoários. A quebra da homeostase do Ca^{2+} pode levar à morte celular por apoptose ou necrose. A regulação das concentrações intracelulares de Ca^{2+} nos tripanosomatídeos é de extrema importância, pois estes parasitos possuem uma única mitocôndria, que ocupa cerca de 12% do volume total do parasito e que é capaz de acumular grandes quantidades de Ca^{2+} . Além da mitocôndria, os acidocalcisomas, estão diretamente envolvidos com a homeostase deste íon em tripanosomatídeos. Assim, fármacos que atuam diretamente na homeostase do Ca^{2+} intracelular ou indiretamente na mitocôndria, acidocalcisomas ou glicosomos vêm sendo amplamente investigados como estratégia promissora de novos alvos terapêuticos (BENAIM; GARCIA, 2011).

1.2 Lectinas

As proteínas são as moléculas mais abundantes nos sistemas vivos. Desta forma, um organismo vivo possui cerca de 15% do seu peso seco constituído por elas. Neste contexto, as lectinas apresentam-se como um grupo de macromoléculas da classe das proteínas com as mais variadas funções como: hormonal, enzimática, defesa, nutricional, receptor de sinais celulares, proteínas de transporte bem como funções estruturais (SHARON, 2007; SHARON e LIS, 2004; 2001). O termo “lectina” (do latim *lectus*, significa selecionado, escolhido) foi proposto por Boyd e Shapleigh em 1954 para designar um grupo de proteínas que apresentava a característica comum de seletividade na interação com carboidratos. O termo aglutinina é usado como sinônimo para lectina, em referência à habilidade de aglutinar células (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Porém, a definição de lectina mais completa foi formulada por Kocourek e Horejsi (apud

JAMES, 1985), de acordo com estes autores lectinas são proteínas não pertencentes ao sistema imunológico. Porém, capazes de reconhecer sítios específicos em moléculas e ligar-se reversivelmente a carboidratos, sem alterar a estrutura covalente das ligações glicosídicas dos sítios (PEUMANS; VAN DAMME 1995, PEUMANS et al., 2001).

1.2.1 Particularidades de lectinas

Lectinas são proteínas que reconhecem e se ligam especificamente a carboidratos. Deve ser enfatizado, no entanto, que a especificidade das lectinas é altamente variável. Algumas proteínas reconhecem e interagem com monossacarídeos como manose, glicose, galactose e fucose, porém algumas lectinas, especialmente as de plantas, se ligam a oligossacarídeos complexos N- ou O-ligados (GHAZARIAN et al., 2011). Além disso, as lectinas diferem entre si quanto à sequência de aminoácidos, requerimentos de metais, peso molecular e estrutura tridimensional.

As lectinas, por possuírem sítios específicos de ligação a carboidratos, são capazes de interagir com diversas moléculas dos fluidos biológicos e receptores de superfície celular, agindo como decodificadores das informações trocadas entre moléculas, células e organismos (HUGHES, 2000). Desta forma, estas proteínas vêm sendo utilizadas na investigação científica como uma ferramenta útil na avaliação e no entendimento de diversos sistemas biológicos. Dentre as diversas aplicações biotecnológicas atribuídas às lectinas, destacam-se a identificação de grupos sanguíneos, a caracterização de microorganismos, a estimulação mitogênica de células imunes, a detecção e o isolamento de carboidratos em solução nas macromoléculas ou em superfície celular (DANG; VAN DAMME, 2015; RABINOVICH; CROCI, 2012; RABINOVICH, 1999; SHARON; LIS, 2001).

A seletividade das lectinas para seus alvos naturais dá-se em função de múltiplos sítios de ligação adicionais aqueles que determinam a especificidade. Os sítios determinantes da especificidade são denominados sítios primários. A multiplicidade de ligações é proporcionada por subsítios de ligação (ou sítios estendidos) ou por subunidades multivalentes. Em ligações que envolvem subsítios, um monossacarídeo (carboidrato específico), usualmente terminal, está intimamente ligado no sítio primário da lectina juntamente com os monossacarídeos posteriores da cadeia de oligossacarídeo (NAGAE; YAMAGUCHI, 2015; GABIUS, 2011).

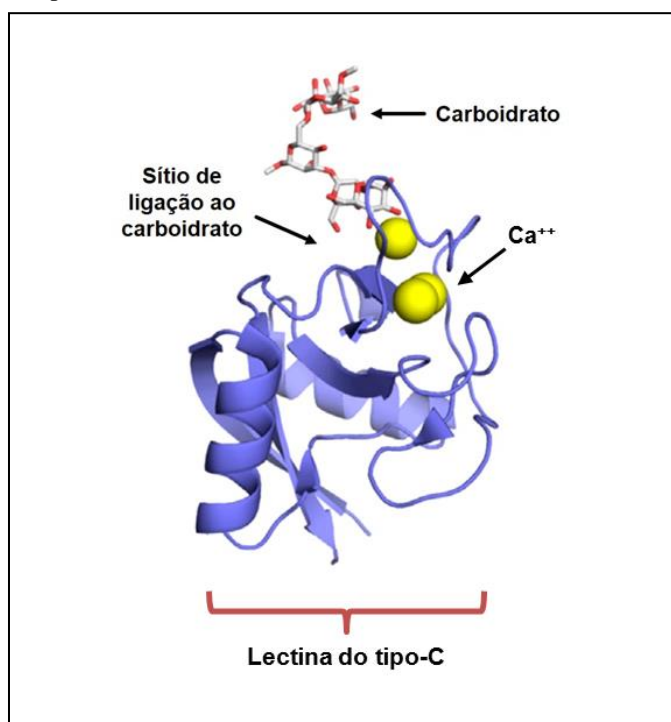
Em relação às cadeias polipeptídicas, as lectinas são caracteristicamente ricas em aminoácidos ácidos hidroxilados, associados por interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e, em alguns casos, pontes dissulfetos (KENNEDY et al., 1995). As especificidades e afinidades dos sítios são alcançadas principalmente por pontes de hidrogênio, com o auxílio de forças de van der Waals e interações hidrofóbicas com resíduos de aminoácidos aromáticos que estão próximos às porções hidrofóbicas de monossacarídeos, contribuindo para estabilidade dos complexos formados (SHARON; LIS, 2001).

Os cátions divalentes, tais como os de Cálcio, estão envolvidos indiretamente no mecanismo molecular de reconhecimento glicídico de algumas lectinas. As cadeias laterais dos aminoácidos, ácido aspártico e asparagina coordenam esses cátions e fazem a ligação de hidrogênio com o glicídio ligante. Portanto, além de servirem para manutenção da integridade das subunidades dessas lectinas, os íons metálicos ajustam os resíduos de aminoácidos envolvidos no sítio ligante glicídico, auxiliando-os na interação com o carboidrato; no entanto não interagem diretamente com o mesmo como ilustrado na Figura 6 (CUMMINGS, 2014; FEINBERG et al., 2001).

1.2.2 Lectinas de animais

As lectinas são conhecidas há mais de um século como constituintes de plantas (CUMMINGS, 1997). Esta concepção está fortemente associada ao conceito de que estas proteínas seriam encontradas exclusivamente em plantas. Porém, as lectinas podem ser encontradas em diferentes fontes, incluindo animais, fungos, bactérias e vírus (RINI, 1995). O isolamento, em 1974, da primeira lectina de mamífero, a asialoglicoproteína hepática, ligante de galactose, foi um dos resultados da pesquisa de Gilbert Ashwell no NIH, juntamente com Anatol G. Morell na Escola de Medicina Albert Einstein (Nova York). Ao mesmo tempo, Vivian Teichberg informou o isolamento do primeiro membro da família das lectinas b-galactose-específicas, designadas galectinas (TEICHBERG et al., 1975; BARONDES et al., 1994). Desta maneira, nas últimas décadas têm-se testemunhado a descoberta de diversas lectinas animais que foram agrupadas conforme descrito no Quadro 1.

Figura 6 - Representação esquemática da estrutura secundária de uma lectina do tipo-C complexada com seu carboidrato ligante específico.



Fonte: Modificado de Nagae e Yamaguchi (2015).

Legenda: As esferas amarelas representam os íons de Ca^{2+} .

Quadro 1 - Classificação das lectinas

Tipo	Exemplo de lectina	Ligante
β-sandwich (Jelly-roll)	Galectinas Calnexina, calreticulina	B-galactosídeos $\text{Glc}_1\text{Man}_9\text{GlcNAC}_2$
C-type	Receptor de asialoglicoproteína Selectinas, MBL	Fuc, Gal, GalNAC
P-type	Receptor de Manose-6-fosfato (MR) e proteínas com domínios homólogos a MR	Man-6-fosfato, $\text{Man}_{5,8}\text{GlcNAC}_2$
β-trefoil	Fator de crescimento de fibroblastos Receptores de manose com domínios ricos em cisteína (macrófagos) Lectina hemolítica	GalNAC-4-sulfato GalNAC Gal
Fibrinogen-like domain	Ficolinas Intelectinas Tachylectina-5	GlcNAC Galf, pentoses Ácido siálico
Hevein-like domain	Neurotoxina de aranha (Selenocosmia huwena); Cardiotoxina de veneno de cobra	GalNAC Dissacarídeos derivados de heparina

Fonte: Adaptado de Gabius e Kayser (2014).

1.2.3 Lectinas Tipo C

A dependência da ligação ao açúcar na presença de íons Cálcio e a preservação na sequência comum de 14 aminoácidos na região invariável e 18 na constante são dois pré-requisitos para a definição de uma lectina tipo C (DRICKAMER, 1992; DRICKAMER; TAYLOR, 1993; NAGAE; YAMAGUCHI, 2015). As lectinas tipo-C do veneno de serpentes são Cálcio-dependentes constituindo-se exclusivamente como homodímeros ou homooligômeros (YAMAZAKI; MORITA, 2007) e tendo como carboidratos ligantes a manose, galactose, fucose, N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina e seus derivados. Além disso, em sua origem, localizam-se principalmente na membrana celular e região extracelular. Possuem funções diversas como, por exemplo, participação na interação célula-célula, na imunidade inata e adquirida e montagem de rede da matriz extracelular.

Figura 7 - Estrutura secundária da BiL, lectina da peçonha de *Bothrops insularis*.



Fonte: Guimarães-Gomes et al. (2004).

Legenda: Ca²⁺ representados pelas esferas cinzas ligadas a galactose. A ponte dissulfeto está apresentada em branco. Arranjos da estrutura secundária em folhas- β estão em verde e as formações α -hélice em vermelho.

1.2.4 Lectina de *Bothrops leucurus* (BLL)

A lectina do tipo-C, isolada a partir da peçonha da serpente *Bothrops leucurus* (BLL, *Bothrops leucurus lectin*), foi purificada por um protocolo eficiente de cromatografia de afinidade em gel de Guar. Assim como outras proteínas do tipo-C, a atividade desta proteína depende de Cálcio e é inibida por açúcares contendo galactosídeos (Figura 7). Estruturalmente é um dímero composto de duas subunidades de 15 kDa unidas por ligações dissulfeto. Além disso, o dicroísmo circular revelou que, em relação a sua estrutura secundária, BLL pode ser classificada como uma proteína toda- β (NUNES et al., 2011).

Em relação a sua aplicação biológica, BLL apresentou atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis*) (NUNES et al., 2011). Além disso, BLL demonstrou ter atividade citotóxica contra diversas linhagens de células tumorais, atuando essencialmente sobre a bioenergética mitocondrial destas células, levando à morte celular (NUNES et al., 2012; ARANDA-SOUZA et al., 2014). Entretanto, quando BLL foi submetida à irradiação, a citotoxicidade induzida por BLL foi abolida em todas as linhagens tumorais testadas. Tais resultados confirmaram que a radiação gama de ⁶⁰Co foi capaz de causar alterações funcionais e estruturais em BLL (NUNES et al., 2012). A diminuição significativa da viabilidade de células da linhagem B16-F10 de melanoma após tratamento com BLL também foi observada. A morte celular foi atribuída a aumentos prévios nas concentrações de cálcio intracelular e de espécies reativas de oxigênio (EROs) mitocondrial, efeito que provavelmente está relacionado com a perda de potencial de

membrana e transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) (ARANDA-SOUZA et al., 2014).

1.2.5 Tripanossomatídeos e as lectinas

As lectinas tem se mostrado promissoras na prospecção de possíveis agentes quimioterápicos contra diversas doenças. Estas proteínas reconhecem com alta especificidade resíduos de carboidratos presentes em proteoglicanas, glicoproteínas e glicolípídeos, os quais desempenham importantes funções tais como: interação parasito-célula, comunicação célula-célula, fertilização, desenvolvimento embrionário, reconhecimento e comunicação celular, entre outros (SITOHY et al., 2007). Em tripanossomatídeos, lectinas também foram utilizadas para avaliar mudanças na composição e distribuição de açúcares na superfície celular durante o processo de transformação de epimastigotas a tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi*, porém existem poucos trabalhos sobre o potencial destas proteínas como agente quimioterápico.

Estudos prévios com a lectina Cramoll 1,4, mostrou que esta proteína causa inibição do crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi*, induz a permeabilização da membrana seguida do influxo de cálcio e acúmulo de cálcio mitocondrial, além de aumentar a produção de ROS mitocondrial e causar decréscimo no potencial de membrana mitocondrial, promovendo a morte celular por necrose (FERNANDES et al., 2010; FERNANDES et al., 2014). Diversos mediadores, organelas e processos celulares têm sido implicados na morte celular, mas ainda não é claro como esses eventos interagem uns com os outros. Entretanto, alterações mitocondriais, produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, permeabilização de membrana mitocondrial, alterações lisossomais e aumento na concentração de Ca^{2+} citosólico parecem estar envolvidos no processo de morte celular induzida pelas lectinas (KROEMER et al., 2009).

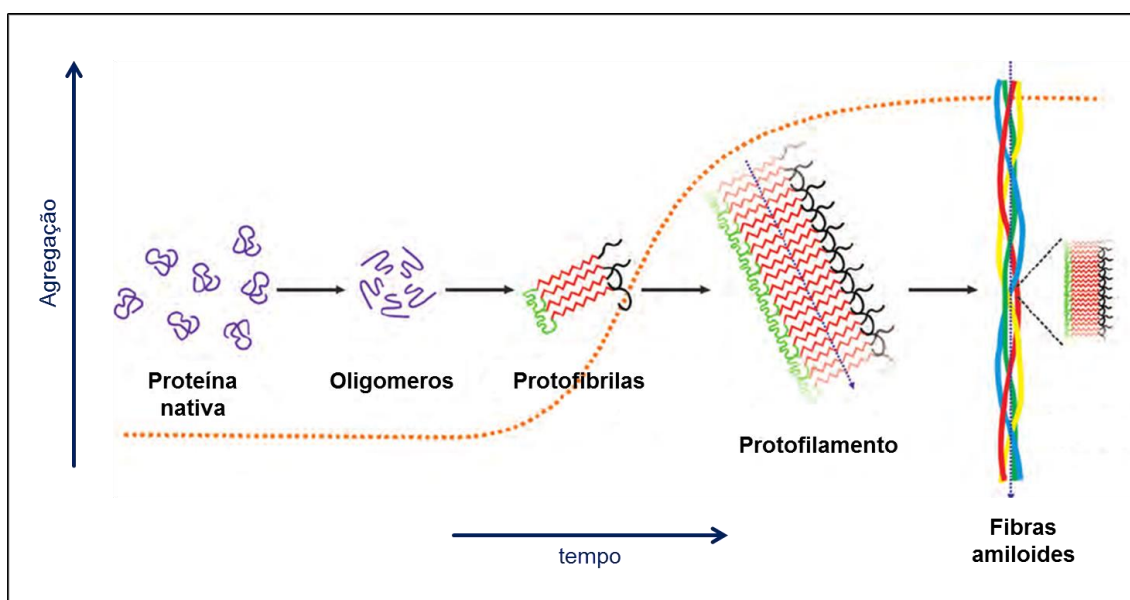
1.2.6 As Lectinas e a Agregação Amilóide

O processo de agregação de proteínas envolve diferentes estágios que compreendem: mudanças na conformação nativa, formação de oligômeros, nucleação e geração de agregados que, por fim, podem originar fibras amiloides (BUELL, 2017; UVERSKY et al., 2004). Os agregados amiloides são compostos por estruturas fibrilares

formadas por protofilamentos, nos quais as estruturas em β -folhas são rearranjadas perpendicularmente ao eixo de alongação. Tais protofilamentos podem se associar a outros protofilamentos originando, desta forma, as fibras amiloides (BEMPORAD e RAMAZZOTTI, 2017) (Figura 8).

O estado amiloide das proteínas foi descoberto inicialmente no contexto de doenças neurodegenerativas como Alzheimer e mal de Parkinson (Hardy e Selkoe, 2002; Dobson, 2003). No entanto, estudos recentes têm demonstrado que estruturas amiloides podem também apresentar funções fisiológicas benéficas. Estas estruturas, chamadas de amiloides funcionais, são utilizadas por diversos organismos para desempenhar funções biológicas como proteção estrutural, regulação e controle da produção e armazenamento de proteínas, além de reconhecimento célula-célula (PHAM et al., 2014).

Figura 8 - Esquema simplificado do processo de agregação amiloide.



Fonte: Modificado de Herzig et al. (2014).

Legenda: Em determinadas concentrações e sob condições específicas, a proteína na forma nativa pode sofrer um desenovelamento da sua estrutura secundária e se reorganizar em grupamentos solúveis denominados oligômeros. O complexo oligomérico irá se rearranjar em pré-fibrilas, formadas essencialmente por estruturas em β -folhas (em vermelho), típicas em agregados amiloides. A ligação *cross- β* entre estas estruturas dará origem aos protofilamentos que, por fim, se organizarão em fibras maduras. A curva sigmóide representada em laranja representa o sinal obtido no monitoramento tempo-dependente quando utilizamos algumas das técnicas padrão para reconhecimento de fibras amiloides (ThT binding essay, Congo Red staining, Dynamic Light Scattering, FTIR, etc.). É possível notar ainda, a baixa sensibilidade desses métodos a estruturas formadas no início do processo de agregação, como os oligômeros tóxicos, por exemplo. Portanto, esta fase inicial da curva sigmóide é chamada de “lag-phase”.

As atividades biológicas atribuídas às lectinas, em geral, estão diretamente relacionadas à manutenção conformacional do Domínio de Reconhecimento a

Carboidratos destas proteínas. Neste sentido, Nunes e colaboradores (2012b) demonstraram que BLL sofre perda da atividade de ligação a carboidratos após ser submetida à irradiação do tipo gama. Tal inibição estaria diretamente relacionada a modificações na estrutura da proteína ou perda de sua capacidade de agregação, afetando a interação do sítio de ligação da lectina com superfícies celulares ou outros substratos ligantes. Neste sentido, estudos anteriores também observaram que, sob condições experimentais específicas, a lectina Concanavalina A poderia sofrer mudanças na sua estrutura nativa desencadeando um processo de agregação amiloide que estaria relacionado ao efeito sobre linhagens tumorais (VETRI et al., 2010; 2011). A formação de agregados amiloides derivados da lectina Con A pôde ser detectada em pH levemente básico e foi caracterizada pela ligação com o marcador fluorescente específico de fibras amiloides Thioflavina T (ThT) e microscopia de força atômica, elucidando todo o processo de agregação desta proteína até a condensação do agregado fibrilar (CARROTA et al., 2012). No entanto, a relação íntima existente entre a estrutura fibrilar amiloide e a atividade das lectinas permanece ainda desconhecida e tem se tornado alvo de relevantes questionamentos científicos, que vão desde o estudo de fármacos e alvos terapêuticos até a compreensão do papel destes agregados em doenças relacionadas à deposição de amiloides, bem como doenças neurodegenerativas relacionadas à deposição destas estruturas.

2 JUSTIFICATIVA

A lectina BLL, objeto de nosso estudo, é ligante de galactosídeo, purificada a partir do veneno da serpente *Bothrops leucurus*. Vários estudos tem demonstrado que esta lectina apresenta importante atividade contra bactérias Gram-positivas, além de citotoxicidade contra diversas linhagens tumorais. (NUNES et al., 2011; NUNES et al., 2012; ARANDA-SOUZA, 2014). Apesar do potencial desta lectina como agente microbicida e antitumoral, seu efeito citotóxico e leishmanicida, bem como seus mecanismos de ação ainda permanecem um campo a ser explorado. No presente trabalho investigamos a atividade in vitro da lectina BLL sobre as diferentes formas evolutivas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, seu potencial citotóxico sobre células de mamífero, bem como os mecanismos de ação nas formas evolutivas do parasito, promastigota e amastigota. Esta investigação se justifica pela possibilidade de esta lectina atuar especificamente em rotas metabólicas do parasito, favorecendo a cura parasitológica sem os severos efeitos colaterais observados no tratamento convencional. Esperamos com os nossos resultados, contribuir para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da leishmaniose, bem como para descoberta de novos e mais eficientes alvos terapêuticos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade leishmanicida da lectina BLL, bem como seus possíveis mecanismos de ação sobre *Leishmania* spp. e células do hospedeiro.

3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a atividade da lectina BLL sobre o crescimento e viabilidade de formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* spp.;
- b) Verificar os efeitos de BLL sobre a função mitocondrial de *Leishmania* spp.;
- c) Investigar o potencial citotóxico da lectina BLL sobre células de macrófagos peritoneais;
- d) Avaliar o papel de BLL na produção de NO e citocinas por macrófagos infectados com *Leishmania* spp.;
- e) Investigar a ultraestrutura de macrófagos infectados com *Leishmania* spp tratadas com BLL.;
- f) Verificar os genes envolvidos no processo de resistência ao tratamento de *Leishmania infantum* com BLL;
- g) Avaliar mudanças estruturais de BLL e mecanismo de ação da proteína sobre macrófagos peritoneais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolamento, purificação e caracterização da lectina

A lectina BLL foi isolada a partir da peçonha de *Bothrops leucurus*, gentilmente cedida pelo Laboratório de Animais Peçonhentos (UFPE). O veneno bruto liofilizado de *Bothrops leucurus* (60 mg) foi dissolvido em tampão CTBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM e CaCl₂ 5 mM, pH 7,5), centrifugado para remoção do material insolúvel e a lectina isolada e purificada como estabelecido por Nunes et al. (2011). A concentração da proteína foi determinada de acordo com Bradford (1976).

4.2 Cultura de Parasitos

Formas promastigotas das espécies *L. amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH-8), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) e *L. infantum* (MHOM/BR/1970/BH46 “BH46” e (MHOM/MA/67/ITMAP-263 “263”) foram utilizadas no presente estudo. Os parasitas foram mantidos em meio Schneider’s (Gibco, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino a 26 °C com duas passagens semanais. Os parasitos da cepa 263 foram cultivados em meio SDM-79 e foram transfectados por eletroporação como descrito anteriormente por Papadopoulou et al. (1992). Para os experimentos foram utilizados parasitas na fase log de crescimento (3 dias) e o crescimento foi monitorado por até 72 h. Formas amastigotas foram obtidas a partir de infecção de macrófagos peritoneais isolados a partir de camundongos Balb/c.

4.3 Avaliação do efeito de BLL sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

4.3.1 Efeito *in vitro* sobre o crescimento e viabilidade de formas promastigotas

Formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (1×10^6 cels/mL) foram incubadas a 26 °C em meio Schneider’s na presença ou ausência de BLL em diferentes concentrações. A densidade celular da cultura foi determinada nos tempos de 24, 48 e 72h utilizando o método de contagem em câmara de Neubauer. A concentração capaz de inibir

o crescimento da cultura em 50 % (IC_{50}) foi determinada por análise de regressão linear utilizando o software SPSS 8.0. Alternativamente, foram investigados os efeitos do carboidrato inibidor da atividade aglutinante da lectina, galactose 200 mM (Gal), bem como do quelante de cálcio (íon essencial para manutenção da capacidade de ligação da lectina a carboidratos), ácido etileno glicol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetico 1 mM (EGTA), sobre a atividade leishmanicida de BLL. Desta forma, as formas promastigotas foram submetidas aos seguintes tratamentos: 1) incubação com a concentração de IC_{50} ; 2) IC_{50} de BLL + galactose 200 mM ou 3) IC_{50} de BLL + EGTA 1 mM. Após 48h de tratamento, a viabilidade celular foi determinada utilizando o kit CellTiter-Glo® Luminescent cell viability assay, baseado na quantificação da produção de ATP pelas células viáveis. O sinal de luminescência foi mensurado utilizando o luminômetro GloMax® (Promega Corporation, USA). Todos os ensaios foram realizados em três experimentos independentes em triplicata.

4.3.2 Avaliação do efeito de BLL sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Para a determinação do potencial de membrana mitocondrial, foi usada a sonda JC-1, como descrito por Fonseca-Silva (2011). Formas promastigotas (5×10^6 células/mL) foram cultivadas por 48 h na ausência ou presença de BLL. As células foram colhidas e ressuspensas em tampão HBSS. O número de células foi obtido através de contagem em uma câmara de Neubauer. Promastigotas (2×10^6 células/mL) foram incubadas com JC-1 (100 μ g/mL) por 10 minutos a 37 °C. Depois de lavar duas vezes com HBSS, a fluorescência foi medida a 530 nm e 590 nm, utilizando um comprimento de onda de excitação de 480 nm. A razão entre os valores obtidos após a leitura em 590 nm e 530 nm foi plotado como o $\Delta\Psi_m$ relativo.

4.3.3 Citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/C

Macrófagos peritoneais (10^6 cels/mL) isolados a partir de camundongos Balb/c foram previamente aderidos em microplacas de 96 poços, tratados ou não com diferentes concentrações de BLL por 48h e então foram submetidos à técnica colorimétrica do MTT (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA). A absorbância foi medida a 540 nm no leitor de multiplacas GloMax (Promega, USA) e a concentração 50% citotóxica (CC_{50}) para as células de mamíferos foi determinada por regressão linear. O índice de seletividade (SI),

que determina o quanto uma droga é citotóxica para o parasita em relação às células de mamífero foi calculado através da razão entre a CC_{50}/IC_{50} . Cada ensaio foi realizado em triplicata de três experimentos independentes.

4.3.4 Efeito *in vitro* sobre formas amastigotas intracelulares

Macrófagos peritoneais obtidos a partir de camundongos Balb/C foram plaqueados a 10^6 células/mL em placas de 24 poços, contendo meio RPMI suplementado com SFB 10%. Após a adesão (3 h, 37 °C, CO₂ 5%), foram infectados com *L. amazonensis* e *L. braziliensis* na razão de 1:20 e 1:10, respectivamente. Após 14h de infecção, parasitos não interiorizados foram removidos por lavagem com meio RPMI. As células infectadas foram incubadas então por 24h com os seguintes tratamentos: 1) BLL (0,8 e 1,6 μ M); 2) BLL + 200 mM galactose; 3) BLL + EGTA 1 mM; 4) Pentamidina 10 μ M. Após tratamento, as células foram coradas com Giemsa (Sigma-Aldrich, EUA) e a porcentagem de macrófagos infectados foi determinada pela contagem randômica de 100 células em triplicata. O Índice de Sobrevivência foi determinado pelo número de macrófagos infectados x número de amastigotas/ total de macrófagos contados.

4.3.5 Avaliação do papel imunomodulador de BLL

O perfil de citocinas em macrófagos tratados e controles, infectados ou não com *Leishmania* foi determinado pela técnica do CBA (Cytometric Beads Array), usando o kit CBA flex (BD Bioscience) para a avaliação simultânea dos níveis das citocinas IL-6, IL-2, IL-4, IL-10, IL-17, TNF- α e INF- γ , de acordo com as recomendações do fabricante. Os sobrenadantes foram analisados por citometria de fluxo através do software BD FACSuite software v 3.0. Com o intuito de analisarmos o efeito dos diferentes tratamentos e/ou infecções sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos, sobrenadantes da cultura foram submetidos ao teste colorimétrico de Griess. A absorbância foi medida por espectrofotometria a 490 nm. A concentração de nitrito foram determinada usando o Nitrito de Sódio como padrão.

4.4 Efeito de BLL sobre diferentes cepas de *L. infantum* e identificação dos possíveis mecanismo de resistência ao tratamento

4.4.1 Efeito de BLL sobre o crescimento de *L. infantum*

Formas promastigotas de parasitos da cepa BH46 (1×10^6 cels/mL) foram incubadas a 26 °C em meio Schneider's na presença ou ausência de BLL em diferentes concentrações. A densidade celular da cultura foi determinada nos tempos de 24, 48 e 72h utilizando o método de contagem em câmara de Neubauer. Os parasitos da cepa 263 também foram submetidos à presença e ausência de diferentes concentrações de BLL em tempos de 24, 48, 72 e 96h, porém a densidade do cultivo foi mensurada através da leitura da absorbância a 600 nm. Para tal, 100 µL foram coletados diariamente e a leitura da densidade óptica foi realizada em espectrofotômetro com leitor de placas de 96 poços. Para ambas as metodologias, a concentração capaz de inibir o crescimento da cultura em 50 % (IC₅₀) foi determinada por análise de regressão linear utilizando o software SPSS 8.0.

4.4.2 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio no citoplasma após tratamento com BLL

A produção de peróxido de hidrogênio foi medida usando H₂DCFA. As formas promastigotas foram tratadas por 48h na ausência ou presença de BLL. As células foram colhidas e resuspensas em tampão HBSS. O número de células foi obtido através de contagem em uma câmara de Neubauer. Promastigotas (10^6 células/mL) foram incubadas com H₂DCFDA (20 µM) por 20 minutos a 37 °C. A fluorescência foi monitorada em comprimentos de onda de excitação e emissão de 507 e 530 nm, respectivamente, em um espectrofotômetro.

4.4.3 Avaliação do efeito de BLL sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Para a determinação do potencial de membrana mitocondrial, foi usada a sonda JC-1, como descrito por Fonseca-Silva (2011). Formas promastigotas (5×10^6 células/mL) foram cultivadas por 48 h na ausência ou presença de BLL. As células foram colhidas e ressuspensas em tampão HBSS. O número de células foi obtido através de contagem em uma câmara de Neubauer. Promastigotas (2×10^6 células/mL) foram incubadas com JC-1 (100 µg/mL) por 10 minutos a 37 °C. Depois de lavar duas vezes

com HBSS, a fluorescência foi medida a 530 nm e 590 nm, utilizando um comprimento de onda de excitação de 480 nm. A razão entre os valores obtidos após a leitura em 590 nm e 530 nm foi plotado como o $\Delta\psi_m$ relativo.

4.4.4 Análise do $\Delta\psi_m$ por microscopia confocal

Para análise do efeito de BLL sobre a mitocôndria dos protozoários foi utilizado o marcador Rodamina 123, para análise do potencial de membrana mitocondrial. Formas promastigotas de *L. infatum* (1×10^6 células/ mL) foram tratadas com a BLL nas concentrações de IC_{50} e $2x IC_{50}$ por 48 horas. Após o tratamento, os parasitos tratados e controles foram incubados com Rodamina 123 (10 $\mu\text{g/mL}$) por 15 min. Como controle positivo, as células foram tratadas com Peróxido de Hidrogênio por 15 min. Células não tratadas (controle negativo) também foram avaliadas. Ao final do tempo de incubação com o marcador, as amostras foram colocadas em micro-placas (Mattek Co., USA) e, posteriormente, analisadas por microscopia confocal a laser utilizando o microscópio Leica SP2 AOBS. As imagens foram adquiridas usando o laser 543 nm.

4.4.5 Indução de resistência ao tratamento com BLL em *L. infatum* da cepa 263

Duas replicatas biológicas foram utilizadas para seleção de resistência ao tratamento com BLL, bem como um controle sem tratamento. Neste ensaio, parasitos da cepa 263 contendo cosmídeos de resistência foram descongelados em 5 mL de meio SDM-79 e incubados a 26 °C por 24h. Em seguida, a cultura foi diluída em 50 mL do mesmo meio suplementado com Higromicina (600 $\mu\text{g/mL}$) e novamente incubado a 26 °C até que alcançassem a fase log de crescimento (em média 3 a 4 dias). Depois, 1 mL da cultura foi diluído (1:50) em meio de cultivo suplementado com Higromicina e contendo BLL (valor de IC_{50}) e novamente incubada a 26 °C. O crescimento foi monitorado diariamente através da leitura de absorbância até que ultrapassasse o efeito do tratamento com BLL e atingissem novamente a fase log de crescimento. Desta forma, uma alíquota de 1 mL foi novamente diluída em meio de cultivo contendo Higromicina, porém acrescido de BLL na concentração de $2x IC_{50}$. Assim sendo, após o crescimento, os parasitos foram tratados com as concentrações de $4x$, $6x$, $8x$ e $16x IC_{50}$, sendo esta última impossível de ser ultrapassada. Em cada etapa do tratamento, quando as células atingiam a fase log de crescimento, 10 mL da cultura foram preparados para congelamento em -80

°C, enquanto que todo o restante foi preparado para extração dos cosmídeos para sequenciamento (GANAZION et al., 2016).

4.4.6 Extração e Purificação dos cosmídeos para sequenciamento

Cosmídeos de parasitos da cepa 263 foram extraídos através de lise alcalina e gradiente fenol-clorofórmio seguidos de tratamento com RNase. Parasitos do gênero *Leishmania* possuem uma única mitocôndria contendo um compacto DNA composto de minicírculos e maxicírculos. Este DNA acaba sendo purificado juntamente com os cosmídeos, contaminando a amostra. Estes fragmentos contaminantes foram separados do *pool* de cosmídeos através de eletroforese em gel de agarose *low-melting* 1%. As bandas com alto peso molecular contendo cosmídeos (~ 50 kb) foram seccionadas e purificadas.

4.4.7 Alinhamento e montagem das sequências

As leituras obtidas para cada amostra foram independentemente alinhadas com o genoma de *L. infantum* JPCM5 (tritrypdb.org/tritrypdb/) como descrito por ASLETT et al. (2010), utilizando o software BWA (Durbin, 2009). Os dados foram processados com SAMStat (LASSMANN et al., 2011) para garantir a qualidade da montagem. BEDTools foram utilizados para converter o formato BAM para o formato BED.

4.4.8 Análise da amplificação dos genes de resistência

Os genes amplificados por CosSeq foram detectados utilizando o software Trinity (HAAS et al., 2013), o qual usa Bowtie e RSEM para realizar o alinhamento e computar a abundância do gene, respectivamente. Os *clusters* foram plotados utilizando *scripts* indicados pelo Trinity package. Apenas genes com mudança de mais de \log_2 vezes (>4) foram mantidos na análise.

4.5 Avaliação do efeito de BLL sobre macrófagos peritoneais de camundongos Balb/C

4.5.1 Citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/C

Macrófagos peritoneais (10^6 cels/mL) isolados a partir de camundongos Balb/c foram previamente aderidos em microplacas de 96 poços, tratados ou não com diferentes concentrações de BLL por 24h e submetidos a técnica colorimétrica do MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A absorbância foi medida a 540 nm no leitor de multiplacas GloMax (Promega, USA) e a concentração 50% citotóxica (CC_{50}) para as células de mamíferos foi determinada por regressão linear. O índice de seletividade (SI), que determina o quanto uma droga é citotóxica para o parasita em relação às células de mamífero foi calculado através da razão entre a CC_{50}/IC_{50} . Cada ensaio foi realizado em triplicata de três experimentos independentes.

4.5.2 Ensaio de Cinética de Agregação amiloide

Amostras de BLL (1 μ M) e BLL 1 μ M + galactose 200 mM foram submetidas a diferentes tempos de incubação (0- 120 minutos) em meio de cultivo RPMI em estufa a 37 °C. O meio RPMI foi utilizado para mimetizar condições fisiológicas do cultivo celular. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 14000 r.p.m. por 20 minutos e ressuspensas em água deionizada.

4.5.3 Marcação com Thioflavina T e Vermelho do Congo

Foi utilizada espectroscopia de fluorescência, através da ligação do fluoróforo Thioflavina-T (ThT), e a espectroscopia de absorbância, através da ligação ao Vermelho do Congo (VC), para analisar a cinética de agregação da BLL. Para ThT, as amostras foram preparadas como descrito no item anterior. Após incubação, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 20 min, ressuspensas em 10 μ L de água deionizada e incubadas com ThT (25 μ M) em PBS. A fluorescência de ThT foi mensurada utilizando um Fluorímetro GloMax® (Promega Corporation, USA) com excitação de 450 nm e emissão de 465-520 nm. Para VC, as amostras foram preparadas como descrito anteriormente, e incubadas com VC 50 μ M em PBS (pH 7,2). A absorbância do VC foi medida entre 400 e 700 nm, o espectro do VC sem BLL ou BLL+galactose foi subtraído do valor do espectro contendo BLL e uma diferença máxima de 540 nm foi considerada indicativa da presença de agregados amiloide-like.

4.5.4 Contrastação negativa

Para examinar a morfologia da proteína/agregados amiloides, BLL foi incubada como descrito anteriormente a 37 °C em meio RPMI na presença ou não de galactose 200 mM. Após lavagem com água deionizada e centrifugação a 14.000 rpm, as soluções foram depositadas em grades revestidas de carbono previamente tratadas com Alcian-blue por 2 min e contrastadas negativamente com acetato de uranila 1% por 1 min. As grades foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai FEI spirit operado a 120 kV.

4.5.5 Marcação de depósitos amiloides intracelulares com Vermelho do Congo

Macrófagos primários de Balb/C tratados ou não com BLL (1 μ M) ou BLL (1 μ M) + galactose (200 mM) foram marcadas com Vermelho do Congo como descrito previamente por Okada et al. (2007) com modificações. Brevemente, as células foram cultivadas em lamínulas de vidro e tratadas ou não com BLL 1 μ M ou BLL 1 μ M + galactose 200 mM, após 24h, foram lavadas 2x com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M, por 2h a 25 °C. Após fixação, as células foram lavadas novamente com PBS e permeabilizadas com Triton-X 1% por 10 min e, em seguida, lavadas 2x com PBS. Posteriormente, as lamínulas foram incubadas em solução de etanol 80% contendo NaCl 0,5M e NaOH 1% (preparados na hora do uso). Em seguida, foram incubadas com Vermelho do Congo 2,5 mM por 1h e lavadas exaustivamente com água Milli-Q. As imagens foram adquiridas utilizando o microscópio Leica DMI4000 B (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) acoplado com lente polarizadora.

4.5.6 Marcação de depósitos amiloides intracelulares com Thioflavina S

Macrófagos primários de Balb/C foram cultivados, tratados, fixados e permeabilizados como descrito no item anterior. Além do tratamento convencional com BLL, as células foram ainda submetidas, 30 minutos antes do tratamento, à incubação com o inibidor de autofagossomos 3-metiladenina (3-MA) e ao inibidor de fagocitose citocalasina B (CitB). Posteriormente, as lamínulas foram incubadas por 1h em PBS contendo ThS 0,1 % (preparada no momento do uso e filtrada em filtro de seringa 0,22 μ m). Após lavagem com etanol 70% por 3x, foi realizada incubação com solução contendo o marcador de material nuclear Hoechst 33258, de acordo com as instruções do

fabricante e as lamínulas foram montadas com Prolong. As imagens de microscopia confocal foram obtidas utilizando o microscópio confocal SPII AOBS, laser 488 nm para ThS e UV para Hoechst 33258.

4.5.7 Imunocitoquímica para microscopia eletrônica de transmissão

Cortes ultrafinos (90 – 100 nm) de material incluído em resina Epoxy, conforme descrito no item 4.4.2 foram coletados em grades de cobre e submetidas a tratamento com peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 0,1%) por 10 min. e em seguida, expostas a solução de cloreto de amônio 50 mM. Em seguida, as grades foram incubadas em solução PSB/BSA 3% e 1% por 15 min cada e 20 min em Tween-20. Neste ponto, as grades foram submetidas a incubação com anticorpo anti fibras amiloides LOC (Merk) (diluição 1:50) por 48h a 4 °C. Em seguida, as grades contendo cortes ultrafinos marcados com LOC foram incubadas por 2h com anticorpo secundário IgG anti-coelho conjugado a nanopartículas de ouro 10 nm (BB international, UK). Após lavagem com água deionizada as amostras foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai FEI spirit operado a 120 kV.

4.5.8 Avaliação do efeito imunomodulador de BLL sobre macrófagos peritoneais

O perfil de citocinas em macrófagos tratados e controles, infectados ou não com *Leishmania* sp. foi determinado pela técnica do CBA (cytometric Beads Array), usando o kit CBA flex (BD Bioscience) para a avaliação simultânea dos níveis das citocinas, de acordo com as recomendações do fabricante. Os sobrenadantes foram analisados por citometria de fluxo através do software BD FACSuite software v 3.0. Com o intuito de analisarmos os efeitos dos diferentes tratamentos e/ou infecções sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos, sobrenadantes da cultura serão submetido ao teste colorimétrico de Griess. A absorbância será medida por espectrofotometria a 490 nm. A concentração de nitrito foi determinada usando o Nitrito de Sódio como padrão.

4.5 Estudo ultraestrutural

A análise da ultraestrutura através de microscopia eletrônica de transmissão foi realizada em macrófagos peritoneais infectados ou não com *L. amazonensis* e *L.*

braziliensis; formas promastigotas de parasitos *L. infantum* da cepa BH46; foram lavados e fixados com uma solução de 2,5% Glutaraldeído, 4% Paraformaldeído em cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7.2 durante 60 min a 4 °C. Após lavadas as amostras foram pós-fixadas com 1% de tetróxido de ósmio, no escuro por uma hora e então foram removidas com auxílio do *cell scraper* (para macrófagos infectados o não), centrifugadas, desidratadas em baterias crescentes de acetona e incluídas em resina Epoxy. Cortes ultrafinos obtidos foram contrastados e examinados ao microscópio eletrônico de transmissão Tecnai FEI spirit operado a 120 kV.

4.6 Análise Estatística

Os dados experimentais foram expressos como sendo a média dos valores \pm erro padrão da média (média \pm e. p. m.), submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo pós teste de Bonferroni para comparações múltiplas ou teste *t* de student quando apenas um parâmetro for comparado entre dois grupos sendo adotado um nível de significância de $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prisma 5.0 (San Diego, USA).

4.7 Comitê de ética em pesquisa

O presente projeto é parte da linha de pesquisa “**Prospecção de novas drogas contra leishmaniose: estudo da atividade de lectinas sobre Leishmania sp.**” (CEUA nº 77/2014). Está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) apresentado no ANEXO A.

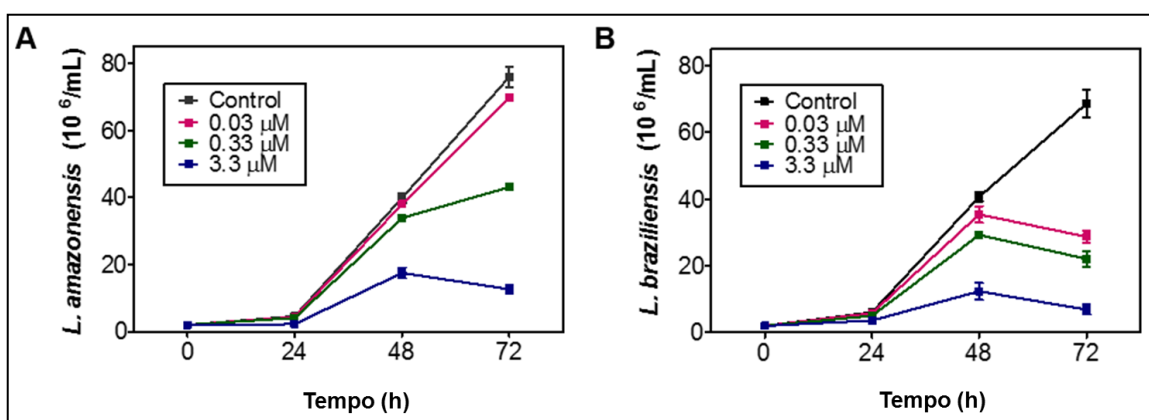
5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do efeito de BLL sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

5.1.1 O tratamento com BLL foi mais seletiva para formas promastigotas do que para células do hospedeiro

A incubação com BLL inibiu significativamente o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* de maneira dose dependente, quando comparadas com as células controle sem tratamento (Figura 9). Comparados ao controle sem tratamento, não foram observadas diferenças significativas na menor concentração testada (0,03 μM) nos tempos de incubação testados em *L. amazonensis*. Por outro lado, na mesma concentração pode ser observada diminuição significativa no crescimento de *L. braziliensis* após 48h de exposição à lectina.

Figura 9- Efeito de BLL sobre o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.



Fonte: A autora.

Legenda: Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$, significativo em relação ao controle não tratado.

A diferença existente entre os perfis de crescimento apresentados por cada espécie é ainda mais pronunciada no tempo de 72h após incubação com BLL. Apesar de *L. braziliensis* ter demonstrado ser mais susceptível a BLL do que *L. amazonensis*, os valores de IC₅₀ calculados após 48h de tratamento, foram muito similares correspondendo a $1,5 \pm 0,17$ e $1,3 \pm 0,06$ μM para *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, respectivamente (Tabela 1). Com o objetivo de analisar o potencial citotóxico de BLL sobre células do hospedeiro mamífero, macrófagos peritoneais tratados ou não com BLL foram

submetidos a técnica de MTT. Nossos resultados demonstraram que a concentração de BLL capaz de inibir a viabilidade celular em 50% foi de $37,57 \pm 3,84 \mu\text{M}$ após 48h de tratamento. Desta forma, o tratamento com BLL demonstrou ser 25 e 28,9 vezes mais seletivo para as formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, respectivamente, do que para os macrófagos peritoneais, como demonstrado através do cálculo do índice de seletividade (IS) (Tabela 2).

Tabela 1. Avaliação do efeito antileishmania e citotóxico da lectina de *Bothrops leucurus*.

Fonte: A autora.

Legenda: IC₅₀, concentração inibitória de 50%; CC₅₀, concentração citotóxica de 50%; IS, Índice de

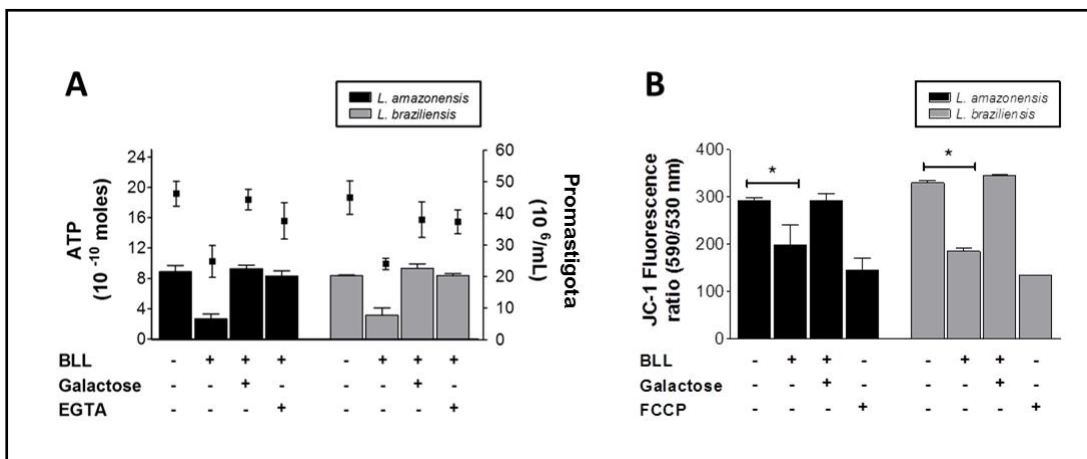
	CC ₅₀ (μM)	Promastigota IC ₅₀ (μM)	Amastigota IC ₅₀ (μM)	IS _{PRO}	IS _{AMA}
Macrófagos peritoneais	$37,57 \pm 3,84$	-	-	-	-
<i>L. amazonensis</i>	-	$1,5 \pm 0,17$	$0,88 \pm 0,24$	25	42,6
<i>L. braziliensis</i>	-	$1,3 \pm 0,06$	$0,86 \pm 0,07$	28,9	43,6

seletividade; PRO, promastigota; AMA, amastigota.

5.1.2 A atividade de BLL sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* é dependente de galactose e íons de cálcio

Para investigar se a capacidade de se ligar a carboidratos, característica das lectinas, seria importante para o efeito da BLL sobre *Leishmania*, os parasitos foram tratados concomitantemente com BLL e galactose. Além disso, para avaliar o papel do Ca²⁺ (essencial para manutenção da ligação lectina-carboidrato) sobre a atividade leishmanicida, os parasitos foram tratados também com EGTA. Nossos resultados mostram que tanto a galactose, quanto o EGTA são capazes de inibir significativamente o efeito de BLL sobre a produção de ATP em ambas as espécies testadas (Figura 10A).

Figura 10- Efeito de Galactose e EGTA sobre a atividade leishmanicida e sobre o potencial de membrana mitocondrial após tratamento com BLL.



Fonte: A autora.

Legenda: (A) Crescimento celular está representado como (■) e a produção de ATP está apresentada em colunas. (B) Alterações no valor relativo ao $\Delta\Psi_m$ estão expressos como a razão das fluorescências mensuradas em 590 nm (para J-agregados) versus 530 nm (para J-monômeros). Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$, significativo em relação ao controle não tratado, as amostras foram submetidas a análise de variância ANOVA, seguida de pós teste de Bonferroni para comparações múltiplas.

5.1.3 BLL promove diminuição do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*

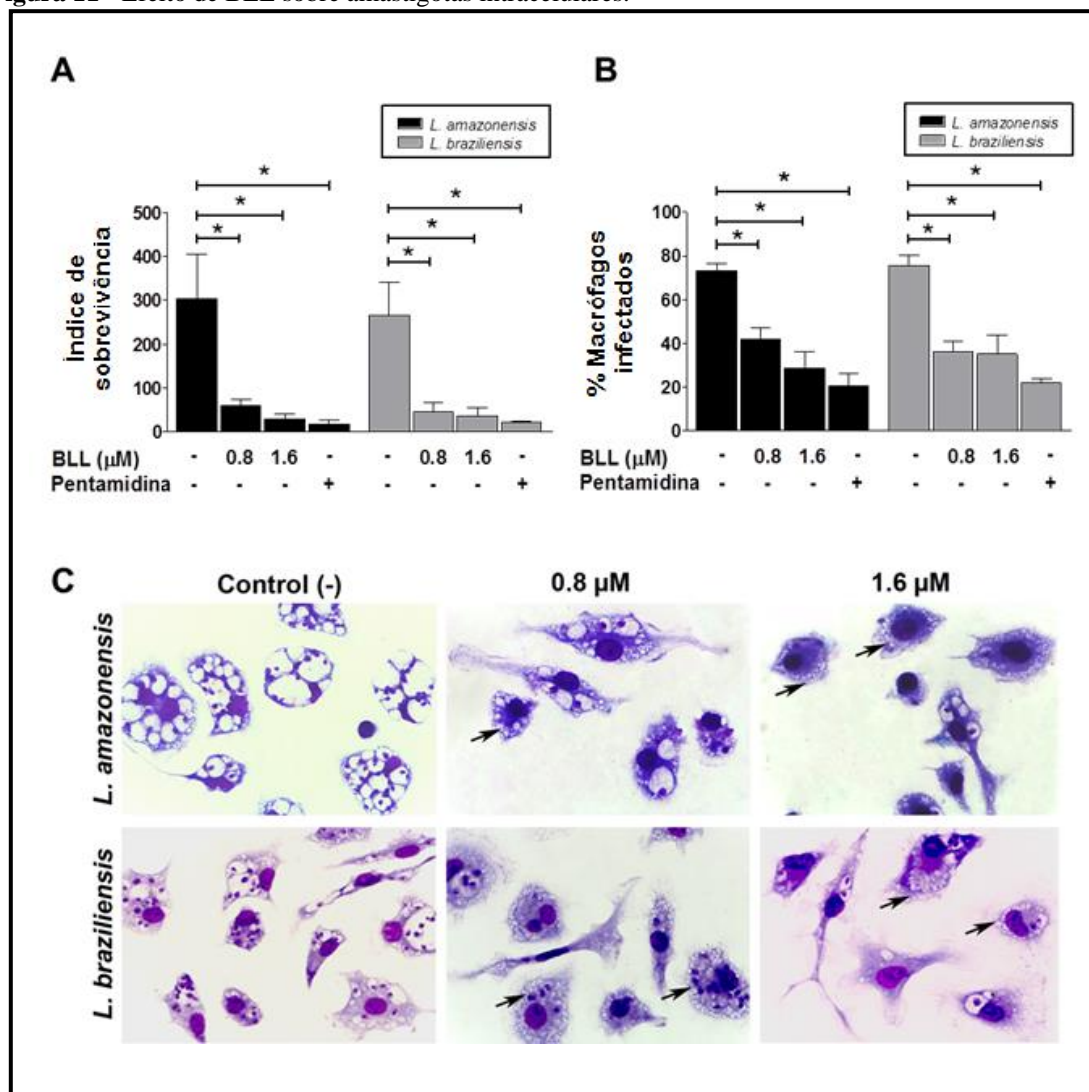
A função mitocondrial dos parasitos foi avaliada utilizando a sonda JC-1. Os dados obtidos através de leitura fluorimétrica indicam diminuição de $31,5 \pm 2,7\%$ e $43,6 \pm 2,2\%$ ($p < 0,004$) no $\Delta\Psi_m$ para *L. amazonensis* e *L. braziliensis* tratadas com BLL, respectivamente (Fig. 10 B).

5.1.4 BLL afetou a sobrevivência de amastigotas intracelulares

Tendo em vista o efeito promissor de BLL sobre as formas promastigotas, seguimos para avaliação do efeito da lectina sobre a sobrevivência de formas amastigotas intracelulares do parasito. O tratamento de macrófagos infectados com BLL diminuiu drasticamente a sobrevivência das amastigotas intracelulares em aproximadamente 28,51% e 36,95% para a concentração de $2 \times IC_{50}$ (BLL $1,6 \mu M$) para as duas espécies (contra $73,33 \pm 3,07\%$ e $75,5 \pm 4,76\%$ em macrófagos controle infectados e não tratados). O tratamento com BLL também diminuiu a porcentagem de macrófagos infectados (Figura 11 B). O efeito de BLL na maior concentração testada foi similar ao efeito observado no tratamento com a droga de referência Pentamidina. Esta, por sua vez, causou inibição de

79,33 % e 78,17 % sobre a porcentagem de macrófagos infectados com *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, respectivamente, quando comparados com o controle sem tratamento (Fig. 11A). Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos BLL (1,6 μM) e Pentamidina (10 μM). A porcentagem de infecção dos grupos tratados com BLL (1,6 μM) foi de $28,5 \pm 7,91\%$ e $35 \pm 8,83\%$ para *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, respectivamente (Figura 11B).

Figura 11 - Efeito de BLL sobre amastigotas intracelulares.



Fonte: A autora.

Legenda: (A) Índice de Sobrevivência de amastigotas em macrófagos infectados com *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, e tratadas com BLL ou Pentamidina (PMD); (B) Efeito de BLL ou Pentamidina sobre a porcentagem de macrófagos infectados com *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. (C) Microscopia óptica de macrófagos peritoneais infectados com *Leishmania* e tratados ou não com BLL. Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$, significativo em relação ao controle não tratado.

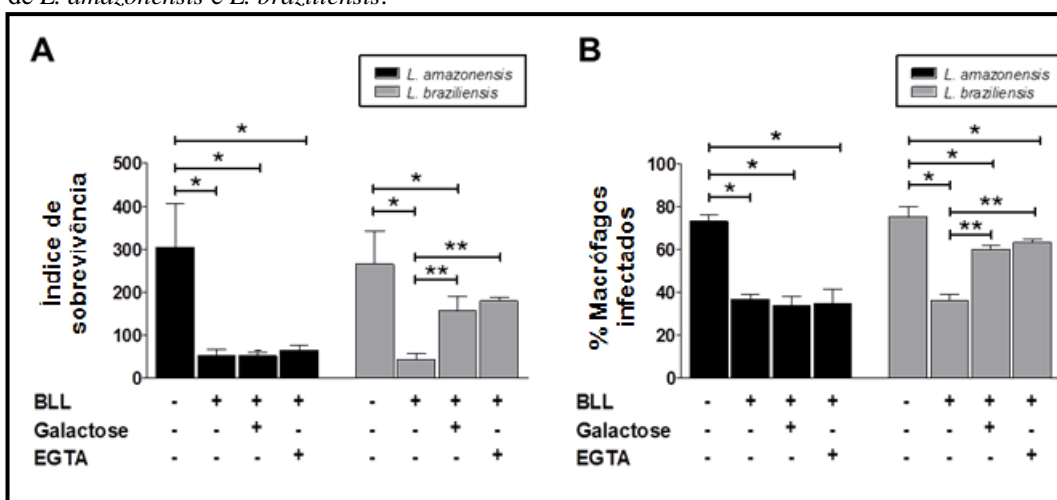
A microscopia de campo claro corroborou com os resultados de inibição da sobrevivência de parasitos dentro dos macrófagos, bem como diminuição no número de

macrófagos infectados. Além disso, nas células tratadas com a maior concentração da BLL (1,6 μM), houve uma diminuição no quantitativo e no volume dos vacúolos parasitóforos (Figura 11C, setas). Foram ainda estabelecidos valores de IC_{50} de $0,88 \pm 0,24 \mu\text{M}$ e $0,86 \pm 0,07 \mu\text{M}$ para *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, respectivamente. Desta forma, BLL demonstrou ter ação 42,6 e 43,6 vezes mais seletiva para *L. amazonensis* e *L. braziliensis* respectivamente, quando em comparação com o valor de CC_{50} para macrófagos peritoneais (Tabela 2).

5.1.5 Macrófagos infectados com *L. amazonensis* e *L. braziliensis* respondem diferentemente à presença de galactose e EGTA durante o tratamento com BLL

Afim de verificar se o efeito de BLL sobre amastigotas intracelulares teria relação com a capacidade de BLL em reconhecer galactose, as células foram simultaneamente incubadas com BLL + galactose ou BLL + EGTA. Nossos resultados demonstraram que galactose e EGTA afetaram de formas diferentes o efeito de BLL sobre *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Para as duas espécies, o tratamento com BLL (IC_{50}) reduziu significativamente a viabilidade de amastigotas intracelulares, bem como a porcentagem de macrófagos infectados pelos parasitos. Para infecção com *L. amazonensis*, a presença de galactose ou EGTA no meio de incubação com BLL não mostrou qualquer influência significativa no efeito da lectina. No entanto, a presença de galactose ou EGTA inibiu significativamente o efeito de BLL sobre formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*. Não foi encontrada, inclusive, diferença significativa entre o índice de sobrevivência de amastigotas controle sem tratamento e tratadas com BLL+EGTA nestes parasitos (Figura 12).

Figura 12 - Efeito do Cálcio e Galactose sobre a atividade de BLL contra formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.



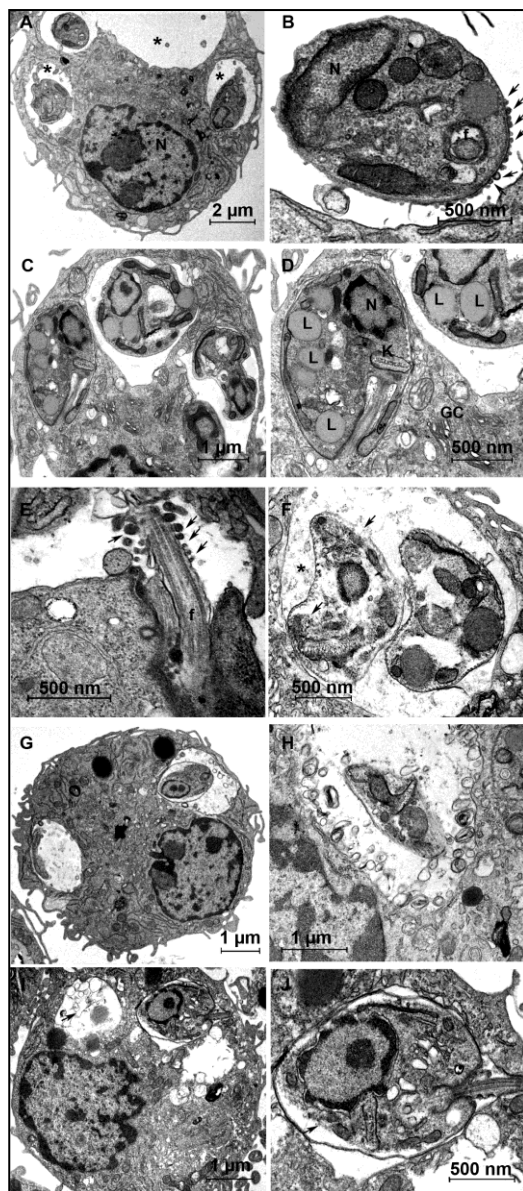
Fonte: A autora.

Legenda: (A) Índice de Sobrevivência de amastigotas intracelulares tratadas ou não com BLL, BLL+Gal ou BLL+EGTA; (B) Efeito da associação de BLL com Gal ou EGTA sobre a porcentagem de macrófagos infectados. Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$, significativo em relação ao controle não tratado.

5.1.6 Efeito de BLL sobre a ultraestrutura de amastigotas intracelulares

Macrófagos infectados com *L. amazonensis* (Figuras 13 A e B) e *L. braziliensis* (Figuras 13 C-E) controles sem tratamento, apresentaram amastigotas intracelulares bem preservados livres ou em estreita associação com a membrana interna de volumosos vacúolos parasitóforos contendo pouco ou nenhum debris celular no seu lúmen (Figuras 13 A-D). Também foi possível observar uma intensa atividade exocítica a partir da membrana plasmática e região flagelar de ambas as espécies testadas (Figuras 13 B e E). O tratamento de macrófagos infectados com BLL induziu alterações similares nas duas espécies. Danos severos à ultraestrutura dos parasitos intracelulares após 24 h de tratamento foram observados mesmo na menor concentração testada (Figura 13 F). As imagens mostraram uma aparente redução no quantitativo e no volume dos vacúolos parasitóforos, bem como no número de amastigotas viáveis (Figuras 13 G e I). As alterações na morfologia induzidas pelo tratamento com BLL incluem ainda a retração e/ou perda do conteúdo citoplasmático indicando lise celular (Figura 13 G). Desta forma, ruptura da membrana plasmática foi uma alteração comumente encontrada em ambas as espécies de amastigotas que sofreram tratamento com BLL (Figura 13 F). No lúmen dos vacúolos parasitóforos, em grupos tratados, foi possível observar numerosos debris celulares, materiais floculados e figuras mielínicas (Figura 13 H). Além disso, também se visualiza a presença de amastigotas parcialmente

Figura 13 - Efeito de BLL sobre a ultraestrutura de amastigotas intracelulares observadas por microscopia eletrônica de transmissão.



Fonte: A autora

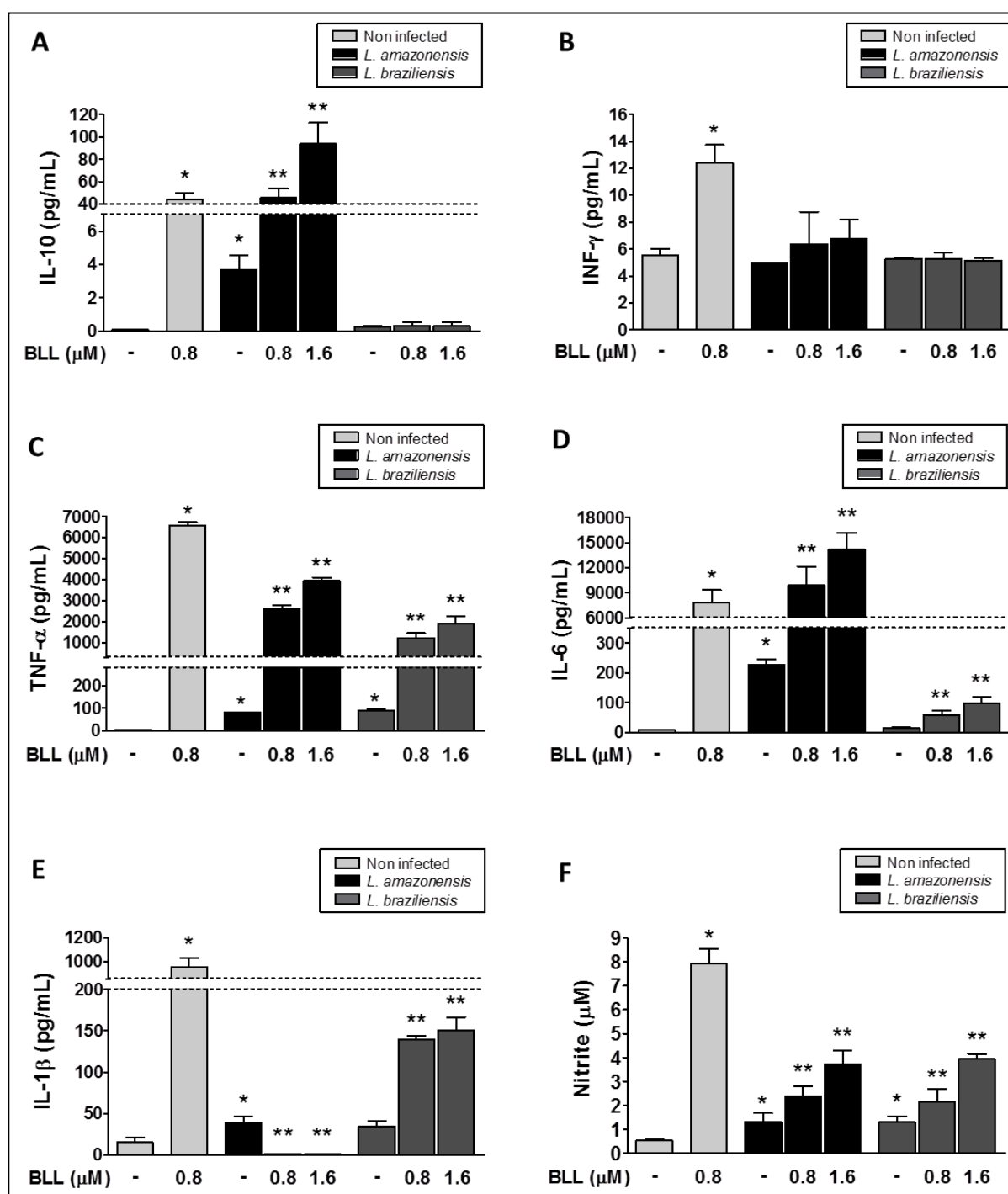
Legenda: (A e B) macrófago infectado com *L. amazonensis* sem tratamento; (A) baixo aumento, mostrando a presença de parasitos na forma amastigota intracelular bem preservados no interior de vacúolos parasitóforos (VP) (*). (B) amastigotas de *L. amazonensis* apresentando alta atividade exocítica na membrana celular (setas). (C) baixo aumento de macrófagos infectados com *L. braziliensis*, apresentando amastigotas no interior de um VP mais compacto. (D) Detalhe em maior aumento do amastigota de *L. braziliensis*, apresentando núcleo bem preservado (N) e numerosas inclusões lipídicas (L) dispersas no citoplasma. (E) Detalhe da região da bolsa flagellar do amastigota de *L. braziliensis* controle sem tratamento, mostrando numerosas vesículas sendo excitadas da membrana na região flagelar. (F) Detalhe do macrófago infectado com *L. amazonensis* e tratado com BLL, apresentando organelas destruídas e ruptura de membrana (setas). Note a presença de material floculado no lumen do VP (*). (G) Baixo aumento de macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratadas com BLL, presença de *debris* celulares e amastigotas com morfologia danificada, além de retração do citoplasma (seta). (H) Detalhe do VP de macrófagos infectados com *L. braziliensis* e tratados com BLL, contendo amastigotas parcialmente degradados, presença de vesículas e figuras mielínicas no interior do VP. (I) macrófagos infectados com *L. braziliensis* mostrando VP contendo material degradado e amastigotas com danos celulares severos. Note em (J), o detalhe da amastigota apresentando espaço eletróluscente entre a membrana plasmática e o citoplasma.

ou completamente degradadas (Figuras 13 G e I). Por fim, também nota-se que, em amastigotas tratados com BLL, não há presença de atividade exocítica observada nos grupos controle sem tratamento (Figuras 13 F e J).

5.1.7 O tratamento com BLL modula diferencialmente a secreção de citocinas e produção de NO em macrófagos infectados com L. amazonensis e L. braziliensis

Para investigar a habilidade de BLL em modular a resposta imune da célula hospedeira, o perfil de citocinas e a produção de NO foram analisados em sobrenadantes de macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Quando comparados com o controle não infectado, a infecção com ambas as espécies testadas induziu um aumento significativo de TNF- α , IL-6 e IL-1 β . O nível de IL-10 demonstrou estar aumentado somente em sobrenadantes de macrófagos infectados com *L. amazonensis* (Figura 14 A), enquanto que a liberação de INF- γ não aumentou em relação ao controle não infectado (Figura 14 B). O tratamento de macrófagos infectados com BLL também induziu um aumento significativo das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6, quando comparadas com o controle infectado sem tratamento (Figura 14 C e D). No entanto, a magnitude destas respostas variou consideravelmente entre as espécies testadas. A secreção de IL-6, por exemplo, foi 10x maior em macrófagos infectados com *L. amazonensis* tratados com BLL em comparação ao grupo infectado com *L. braziliensis* submetido ao mesmo tratamento. Por outro lado, os níveis de secreção de IL-1 β foram significativamente reduzidos em macrófagos infectados com *L. amazonensis* tratados com BLL (Figura 14 E). A produção de nitrito foi semelhante em células infectadas com ambas as espécies testadas e posteriormente submetidas a tratamento com BLL. A incubação com a lectina induziu um aumento de 4x nos níveis de nitrito nos grupos infectados e tratados em comparação ao não tratado (Figura 14 F).

Figura 14 - Efeito de BLL na produção de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias.



Fonte: A autora.

Legenda: (A-E) Representam a produção de citocinas no controle não infectado e infectado, além de macrófagos infectados e tratados com BLL. (F) Produção de Nitrito sob as mesmas condições. (*) Diferença significativa quando comparado ao controle não infectado e (**) Diferença significativa quando comparado ao controle infectado.

5.2 Efeito de BLL sobre diferentes cepas de *L. infantum* e identificação do mecanismo de resistência ao tratamento

5.2.1 BLL inibe o crescimento de formas promastigotas de *L. infantum* wild type e não é citotóxica as células da linhagem Vero

O efeito de BLL sobre *L. infantum* também foi avaliado por contagem direta em câmara de Neubauer. O número de células viáveis contadas após tratamentos com BLL (0,5 – 4 μM) diminuiu quando comparado com o controle sem tratamento. A concentração necessária para inibição de 50% do crescimento (IC_{50}) estimada em 48h foi de 2,1 μM . Um critério importante na descoberta de novas drogas com ação leishmanicida é a baixa toxicidade às células de mamíferos e, portanto o potencial citotóxico da BLL também foi observado sobre células Vero através do método do MTT. De acordo com os dados expostos na Figura 10, quando testado contra células Vero, BLL demonstrou baixa citotoxicidade, apresentando CC_{50} de 37,44 μM . O valor das CC_{50} das células Vero foi comparado com a IC_{50} de *L. infantum*, permitindo a determinação do índice de seletividade (ISe), que informa quanto a droga é seletiva para o parasita em relação às células de mamífero (Tabela 3). Com base no ISe, podemos dizer que BLL foi cerca de 18x mais seletiva para *L. infantum* que para células da linhagem Vero.

Tabela 2- Avaliação do efeito antileishmania e citotóxico da lectina de *Bothrops leucurus*.

Promastigota <i>L. infantum</i> IC_{50} (μM)	Células VERO CC_{50} (μM)	Índice de seletividade (IS)
2,1 \pm 0,59	37,44 \pm 1,62	17,82

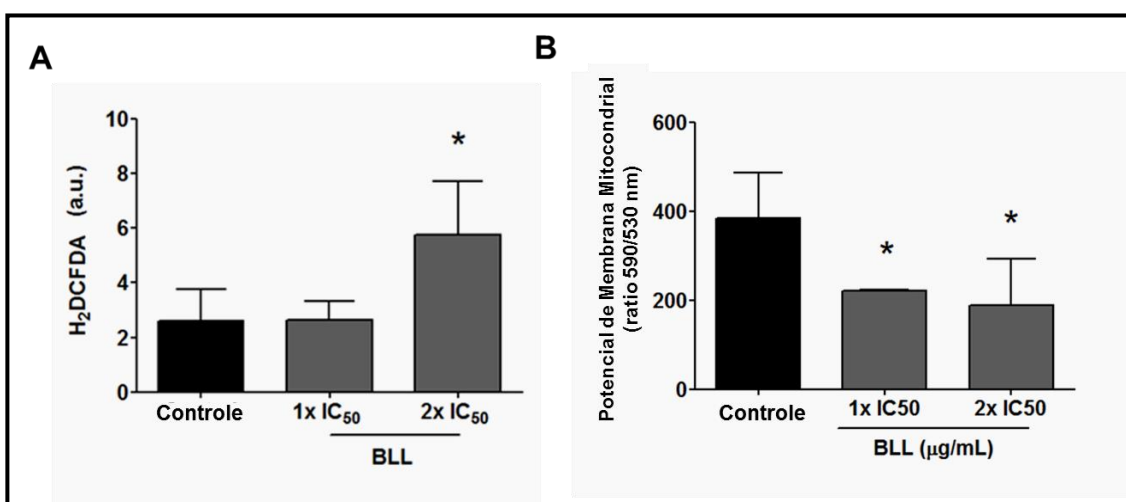
Fonte: A autora.

Legenda: Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

5.2.2 BLL promove aumento da produção de Espécies Reativas de Oxigênio e diminuição do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em formas promastigotas wild type de *L. infantum*

A produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) após 48 h de tratamento com BLL (IC_{50} e $2xIC_{50}$) foi analisada para entender os mecanismos envolvidos na morte de *L. infantum*. Os dados demonstram que a incubação dos parasitos na presença de BLL ($2xIC_{50}$) foi capaz de promover um aumento de cerca de três vezes na produção de ROS citosólico (Figura 15 A). É interessante notar que o aumento dos níveis de ROS foi acompanhado pela perda de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em *L. infantum* tratadas com BLL também em 48h (Fig. 15 B). O ensaio com o marcador fluorescente JC-1 foi capaz de demonstrar que mesmo na concentração de IC_{50} , na qual não houve aumento significativo de ROS, foi possível observar diminuição de 42,7% no $\Delta\Psi_m$.

Figura 15 - Efeito de BLL sobre a produção de espécies reativas de oxigênio citosólicas (A) e potencial de membrana mitocondrial (B) em formas promastigotas de *L. infantum*.



Fonte: A autora.

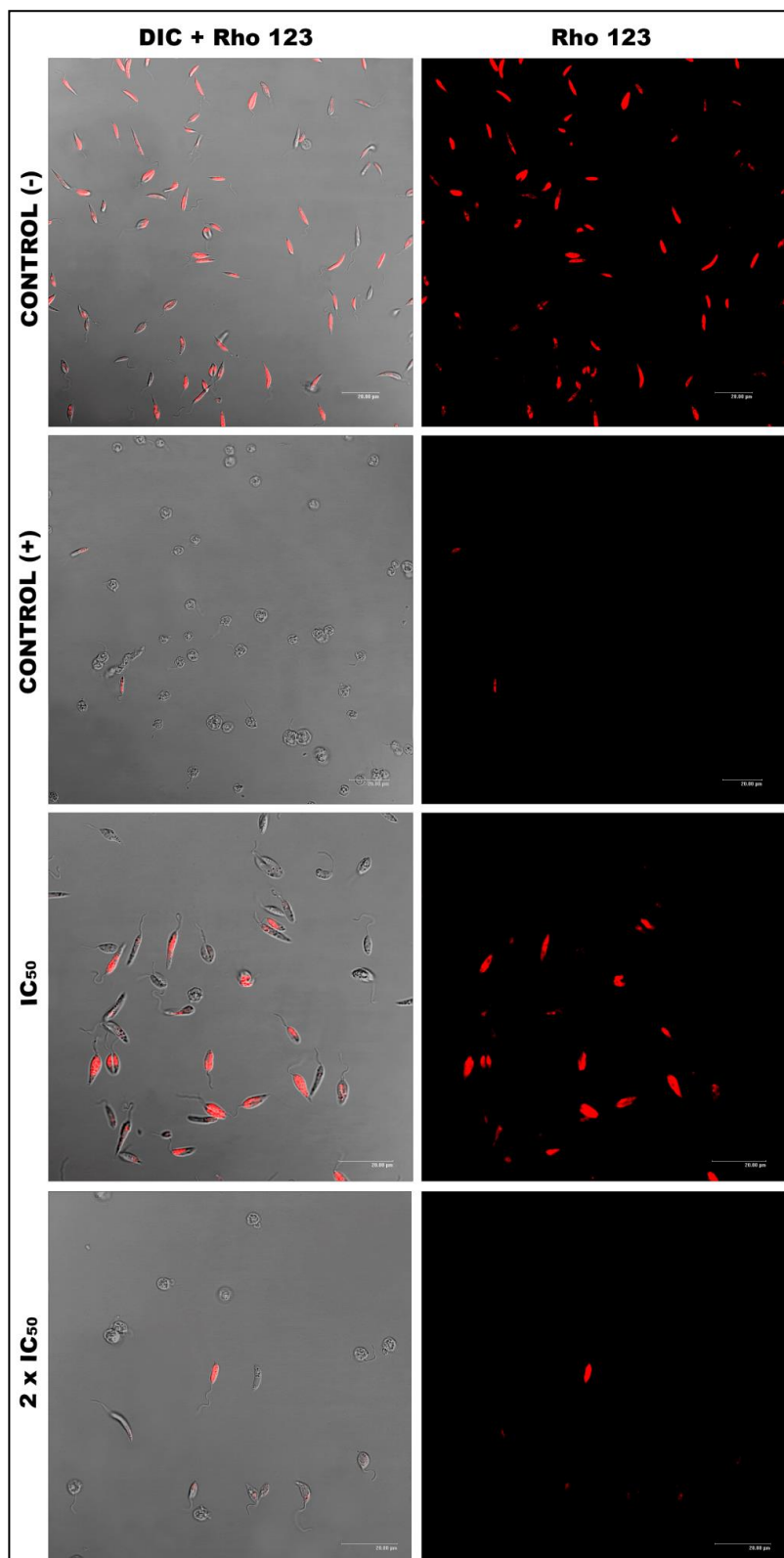
Legenda: Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$, significativo em relação ao controle não tratado.

5.2.3 A incubação com BLL está relacionada a alteração no potencial de membrana da mitocôndria em promastigotas de *L. infantum*

Afim de elucidar o efeito de BLL sobre a função mitocondrial de formas promastigotas de *L. infantum*, os parasitos tratados ou não com BLL foram submetidos a marcação com rodamina 123 e analisados por microscopia confocal para detectar possíveis alterações no potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Em nossas imagens, é possível observar uma diminuição na intensidade de fluorescência da Rodamina 123

nos parasitos submetidos ao tratamento com BLL, em especial na concentração de $2x IC_{50}$ (Figura 16 C e D). As imagens de microscopia confocal corroboram os dados encontrados com o marcador JC-1, indicando uma intensa atividade da lectina sobre a bioenergética mitocondrial destes parasitos, causando a aparente perda do potencial de membrana mitocondrial observada.

Figura 16 - Efeito de BLL sobre o potencial de membrana mitocondrial de formas promastigotas de *L. infantum*.



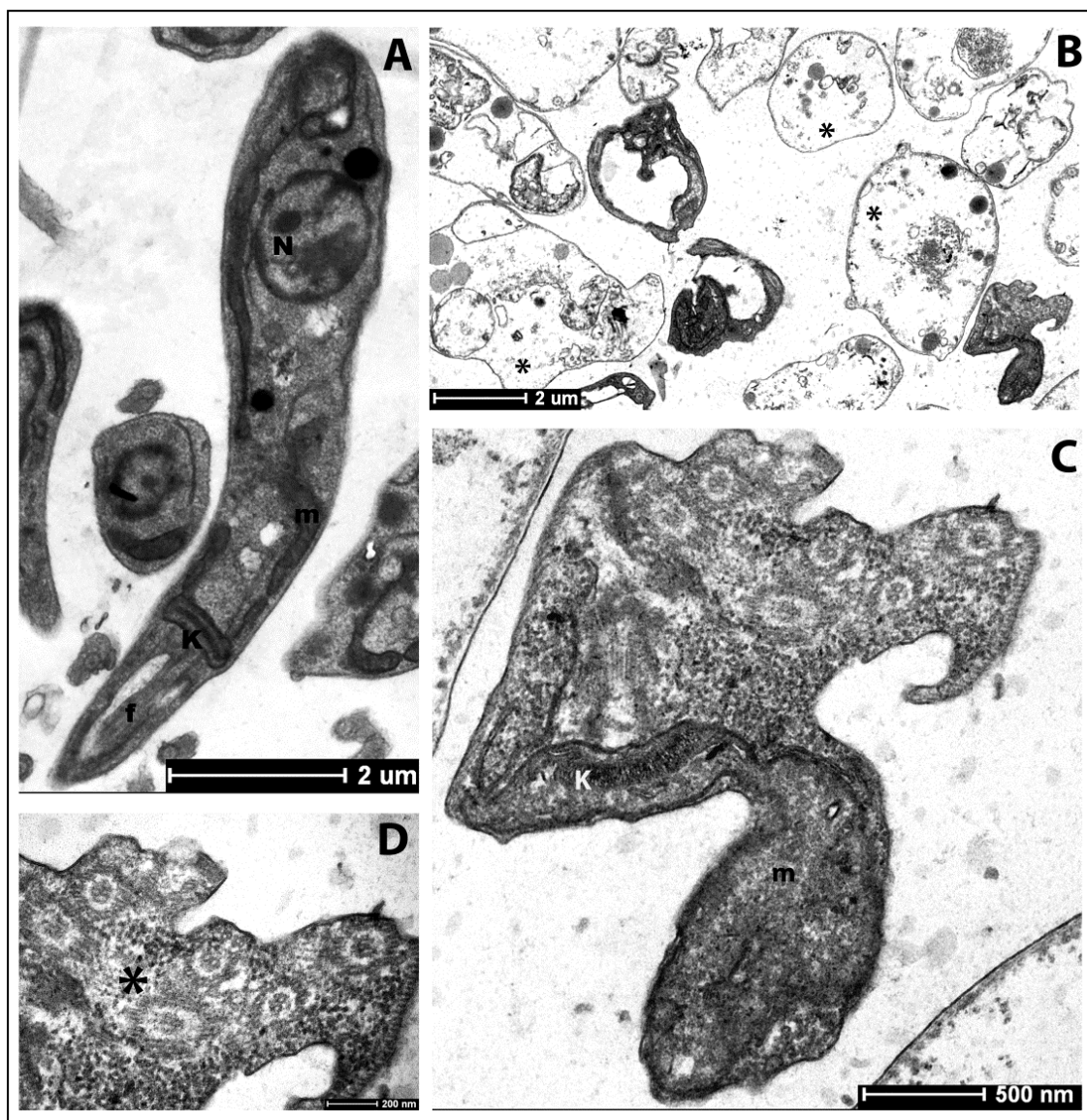
Fonte: A autora.

Legenda: Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

5.2.4 Efeito de BLL sobre a ultraestrutura de promastigotas de *L. infantum*

Para identificar prováveis alvos intracelulares de BLL, foi realizada uma análise da ultraestrutura de promastigotas de *L. infantum* submetidos ou não ao tratamento com BLL.

Figura 17 - Efeito de BLL sobre a ultraestrutura de *L. infantum*.



Fonte: A autora.

Legenda: A) célula controle sem tratamento; B) aspecto da cultura de promastigotas tratadas com a IC_{50} de BLL mostrando intenso dano celular com perda de material citoplasmático (asterisco); C) Detalhe de uma promastigota tratada com BLL mostrando o inchaço mitocondrial e com desestruturação das cristas mitocondriais (m). Também pode-se observar a presença de múltiplos axonemas flagelares (asterisco); D) Detalhe da mesma célula vista em C evidenciando a presença de múltiplos flagelos em uma única célula. N, núcleo; k, cinetoplasto, f, flagelo.

Como observado através de microscopia eletrônica de transmissão, parasitos controles não tratados apresentaram morfologia alongada, núcleo com cromatina associada à membrana interna do envoltório nuclear, e citoplasma granular homogêneo (Figura 17 A). Uma única mitocôndria ramificada e cinetoplasto preservado também podem ser observados (Figura 17 A). Alterações na morfologia já puderam ser observadas em células tratadas com a IC₅₀ de BLL. A maior parte das células apresentaram intensa perda de material citoplasmática, dando a aparência de “ghost cells” (células fantasmas) onde apenas os limites impostos pela membrana plasmática e remanescentes de estruturas citoplasmáticas podem ser observadas (Figuras 17 B). Um aspecto interessante foi o aparecimento, nas células menos afetadas, de múltiplos axonemas, indicando que a BLL poderia estar afetando o processo de divisão celular do parasito. Por fim, observamos a destruição das cristas mitocondriais, bem como inchaço e alteração na morfologia do cinetoplasto associado (Figura 17 C-D).

5.2.5 Indução de resistência ao tratamento com BLL em parasitos *L. infantum* da cepa 263

Para seleção dos clones resistentes ao tratamento com BLL, parasitos da WT *L. infantum* contendo cosmídeos de resistência, foram descongelados e cultivados em meio na presença de higromicina B. Após crescimento, realizamos o tratamento com concentrações crescentes de BLL, iniciando com a concentração de IC₅₀ e dobrando a concentração a cada passagem consecutiva. À medida que os parasitos contendo cosmídeos conseguiam sobreviver a cada exposição de BLL, obtivemos a expansão de subpopulações específicas que seriam resistentes à cada concentração utilizada. Os cosmídeos foram, desta forma, extraídos dos parasitos assim que atingiam a fase estacionária de crescimento. Cosmídeos purificados (50 ng) foram obtidos para preparação das bibliotecas utilizando o kit Nextera DNA Sample Preparation (Illumina) de acordo com as instruções do fabricante. Por fim, sequenciados utilizando um Illumina HiSeq system na concentração final de 8 pM.

5.2.6 Determinação dos genes de resistência ao tratamento com BLL

O *screening* realizado em parasitos resistentes a 5 diferentes (e crescentes) concentrações de BLL revelou a amplificação na expressão de diversos cosmídeos, porém

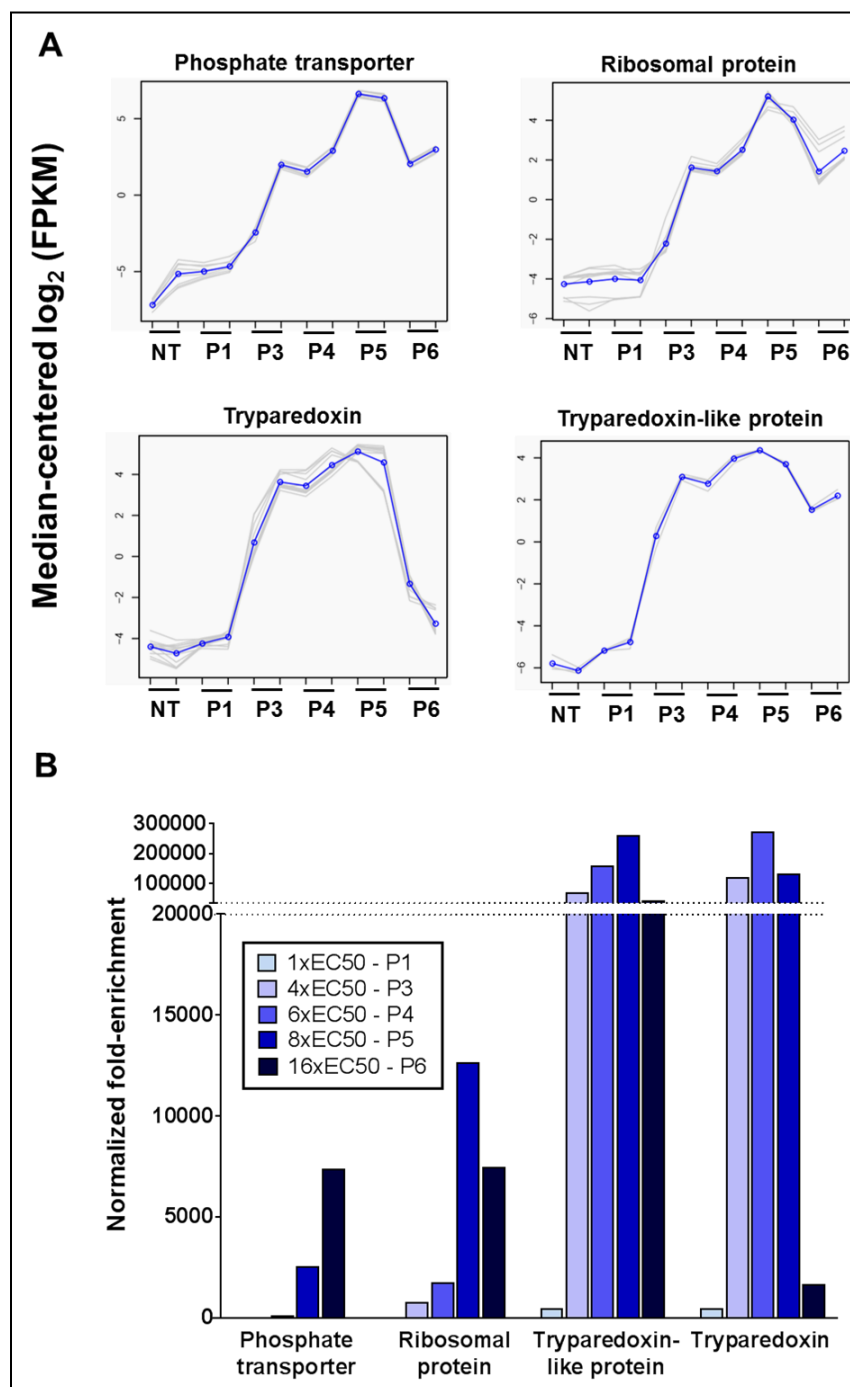
a maioria deles associado a baixos níveis de resistência. A seleção de cosmídeos resistentes a BLL para análise por sequenciamento (*BLL Cos-Seq selection*) detectou 60 *loci* amplificados, no entanto, como observado na Figura 18, apenas 4 desses *loci* apresentaram amplificação significativa conferida pelos cosmídeos Ld03 (Proteína transportadora de fosfato), Ld29a (Proteína ribossomal), Ld29b e Ld29c (Proteínas Tryparedoxinas) (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise por Cos-Seq dos *loci* genômicos enriquecidos.

Locus do cosmídeo	Gene start	Gene stop	Posição genômica	Incremento (x)	Gene de resistência	Produto do gene
Ld03 (3)	0470	0490	172492 - 189243	7,368	LdBPK_030480	Transportador de fosfato
Ld29a (2)	1160	1200	430353 - 442812	12,635	LdBPK_291160	Proteína ribossomal
Ld29b (3)	1210	1230	449255 - 462041	260,698	LdBPK_291220	Proteína Triparedoxina-like
Ld29c (4)	1240	1270	466375 - 481093	272,077	LdBPK_291250	Triparedoxina

Fonte: A Autora.

Figura 18 - Identificação por Cos-Seq dos loci relacionados com a resistência ao tratamento com BLL.



Fonte: A autora.

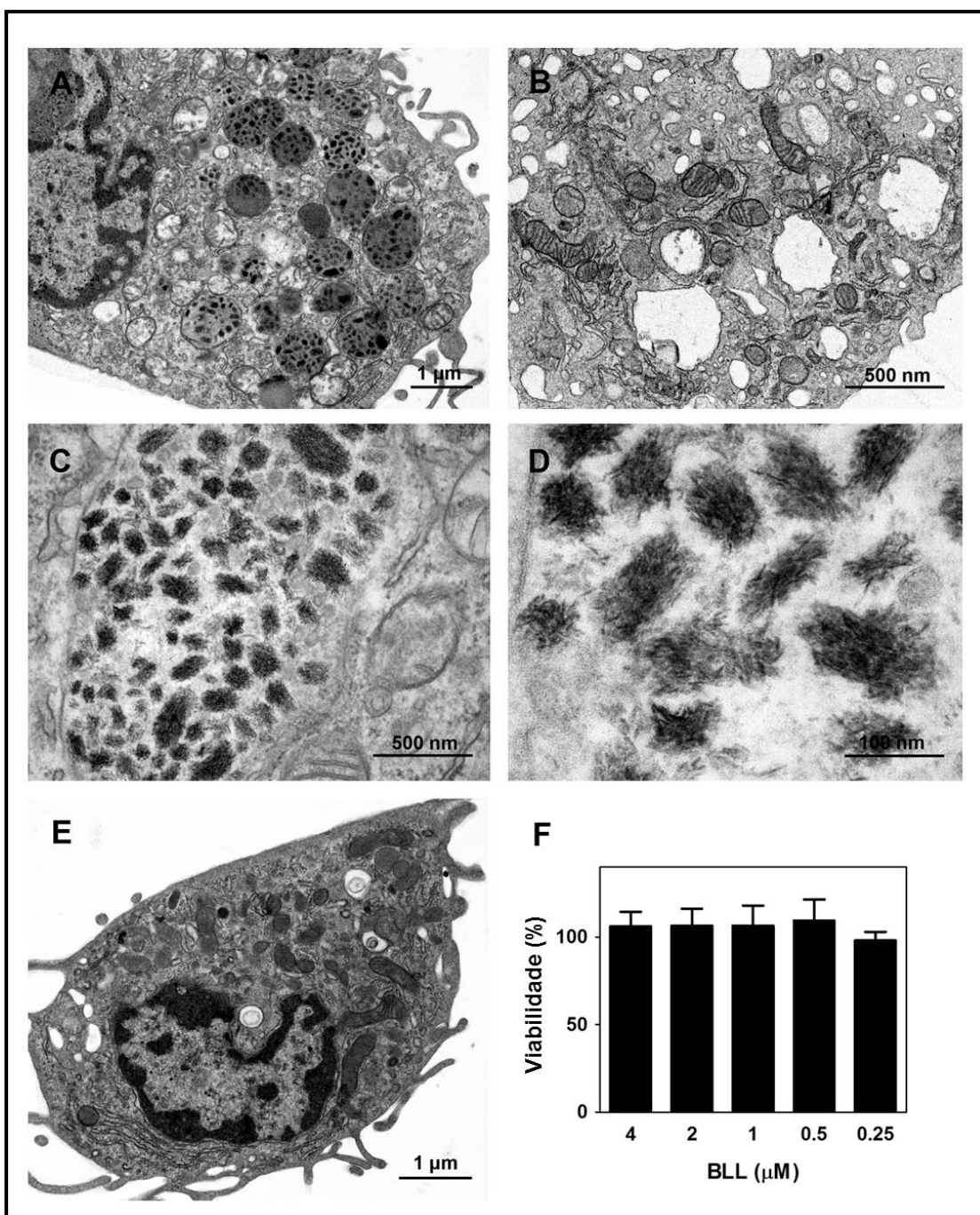
Legenda: (A) Plots representativos dos quatro clusters de genes enriquecidos encontrados na análise do Cos-Seq. Linhas em cinza representam genes individuais e as linhas em azul representam a média para cada cluster. A abundância de cada gene está expressa no eixo y como valor da mediana de FPKM (*fragments per kilobase per million mapped reads*) representado em logaritmo binário. As amostras foram ordenadas no eixo x como não tratado como NT, tratados com 1xIC50 como P1, seleção gradual por incremento da concentração para 4xIC50, 6xIC50, 8xIC50 e 16xIC50 como P3, P4, P5 e P6, respectivamente. (B) Enriquecimento dos 4 cosmídeos representativos para cada incremento na concentração de BLL, normalizado com o controle sem tratamento.

5.3 Avaliação do efeito de BLL sobre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c

5.3.1 Alterações ultraestruturais em macrófagos peritoneais tratados com BLL

A análise ultraestrutural demonstrou que quando comparados as células controle cultivadas em meio de cultivo na ausência de BLL (Figura 19 E), macrófagos tratados com BLL apresentaram numerosas estruturas, no interior de vesículas no citoplasma, contendo material eletrondenso com características de agregados fibrilares (Figura 19 A, C e D). Estas estruturas apresentaram aparência similar a fagossomos (com matriz eletróluscente) ou fagolisossomos (com matriz eletrondensa). Contrariamente, quando as células foram incubadas com BLL na presença de galactose, foram observados vesículas que não continham nenhum tipo de material em seu interior (Figura 19 B). Outra característica observada em macrófagos tratados com BLL foi a preservação da estrutura celular semelhante ao controle não tratado, apresentando núcleo com morfologia típica contendo heterocromatina associada a membrana nuclear e numerosas mitocôndrias em todas as condições testadas, indicando preservação da viabilidade celular e corroborando os dados encontrados no ensaio de MTT (Figura 19 F).

Figura 19 - Análise da ultraestrutura de macrófagos tratados com BLL.



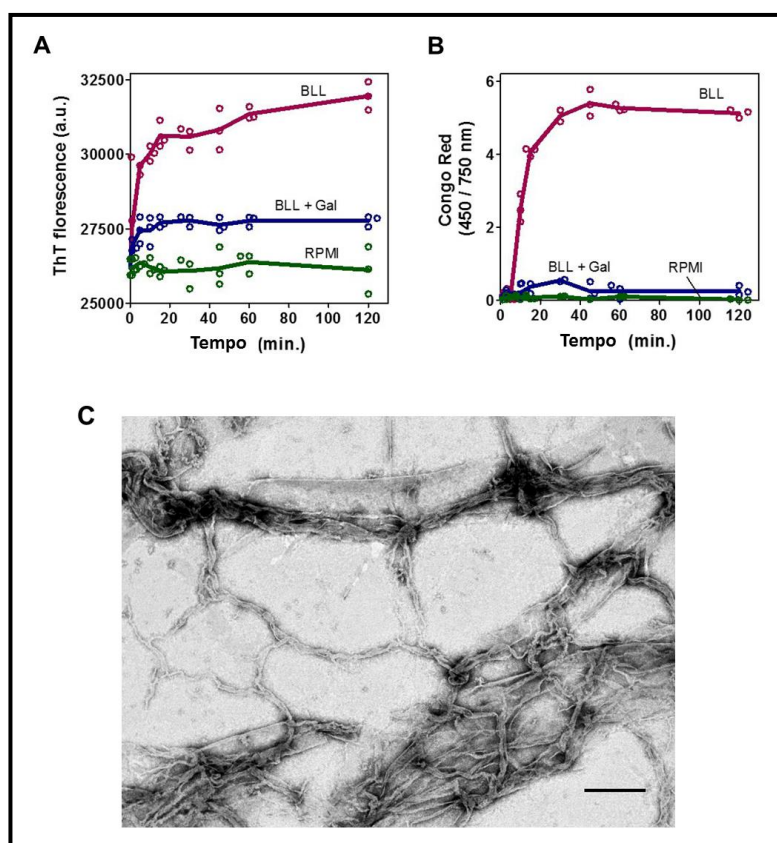
Fonte: A autora.

Legenda: (A) Representa macrófagos tratados com BLL 1 μM por 24 h. Note a presença de numerosas vesículas contendo material fibrilar; (B) macrófagos tratados com BLL 1 μM na presença de galactose 200 mM, não são observadas estruturas fibrilares no interior dos vacúolos; (C and D) detalhe da estrutura fibrilar no interior dos compartimentos intracelulares; (E) controle sem tratamento e (F) efeito de BLL sobre a viabilidade de macrófagos, as colunas representam a porcentagem de células viáveis quando comparadas ao controle sem tratamento. Os valores representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

5.3.2 Formação de agregados amiloide-like a partir da incubação de BLL em condições de cultivo celular

A partir da observação de estruturas *amiloide-like* no interior de macrófagos cultivados em meio RPMI e tratados com BLL, investigamos se a BLL estaria sofrendo um processo de agregação fibrilar. A formação de fibras derivadas de BLL foi caracterizada sempre em incubação em meio RPMI a 37 °C, mimetizando, desta forma, as condições utilizadas no cultivo de macrófagos peritoneais. A presença de estruturas fibrilares foi monitorada utilizando Tioflavina T (ThT) e Vermelho do Congo (VC), corantes que possuem alta especificidade para agregados amiloides por se ligarem à estrutura secundária em β -folha característica destas formações (CHITI; DOBSON, 2017).

Figura 20 - Caracterização Bioquímica e Morfológica das fibras amiloide-like derivadas de BLL.



Fonte: Autora.

Legenda: . (A) Medida de fluorescência de ThT e (B) Curva de absorvância da marcação com Vermelho do Congo para BLL, BLL+Galactose and meio RPMI a 37 °C, pH 7.2. Linhas contínuas representam a média de três replicatas para cada tempo. (C) Contrastação negativa de agregados derivados de BLL após 15 min de incubação com RPMI visualizados por Microscopia Eletrônica de Transmissão. Barra (C) representando 500 nm.

Nossos resultados demonstraram um aumento tempo-dependente na emissão de fluorescência da ThT para BLL em RPMI, quando comparados com a fluorescência de RPMI sem BLL. Tal aumento na emissão atingiu um platô em aproximadamente 60 min após o início da incubação a 37 °C (Figura 20 A). Estes dados sugerem fortemente que após incubação em meio RPMI a 37 °C, BLL passa por um processo de agregação, originando estruturas amiloide-*like*. A análise espectrofotométrica da marcação com o VC corroborou este achado, reforçando a ideia de que ocorre formação de tais estruturas nestas condições ditas “fisiológicas” (Figura 20 B). No entanto, para marcação com VC, o platô foi atingido em cerca de 40 min após incubação com de BLL em RPMI a 37 °C. Para investigamos se haveria influência da presença do açúcar ligante no processo de formação dos agregados amiloide-*like*, a lectina BLL (1 μ M) foi concomitantemente incubada na presença de galactose 200 mM, em meio RPMI e acompanhada simultaneamente através das análises descritas acima. Para as duas marcações testadas, o sinal de fluorescência, para a Tioflavina T, e de absorbância, para o Vermelho do Congo, demonstraram ser significativamente mais baixos quando comparado com o sinal das amostras de BLL em RPMI. Este dado sugere que o domínio de reconhecimento a carboidrato tem relevância no processo de agregação e formação das fibras amiloide-*like*.

Em adição às marcações com ThT e VC, procedemos a preparação da amostra de BLL incubada nas mesmas condições (RPMI, 37 °C) por 15 minutos, para microscopia eletrônica de transmissão em contrastação negativa. A observação em MET corrobora nossos achados confirmando a natureza fibrilar dos agregados derivados de BLL (Figura 20 C). Vale ainda salientar que, neste tempo de incubação, já não observamos mais estruturas oligoméricas, fase esta que antecederia a formação da fibra amiloide propriamente dita.

5.3.3 Fibras amiloide-*like* derivadas de BLL se acumulam no interior de macrófagos

Para investigar se os agregados fibrilares de BLL formados em meio RPMI e internalizados por macrófagos peritoneais realmente correspondiam a fibras amiloides, as células foram incubadas com BLL em meio RPMI (37 °C) por 24h e, em seguida, marcadas com vermelho do Congo, montadas e observadas em microscópio de luz polarizada. A presença de birrefringência de cor verde maçã, indicativa de fibras amiloides, pode ser observada principalmente na região da membrana plasmática das células incubadas com BLL (Figura 21). Tais dados sugerem de que a membrana celular

dos macrófagos seria o sítio de ligação e acúmulo das fibras derivadas de BLL. No entanto, também foi observada marcação em algumas estruturas intracelulares de macrófagos incubados com BLL e nenhuma marcação pode ser observada nas células controle sem tratamento ou mesmo nas células mantidas na presença de BLL+galactose.

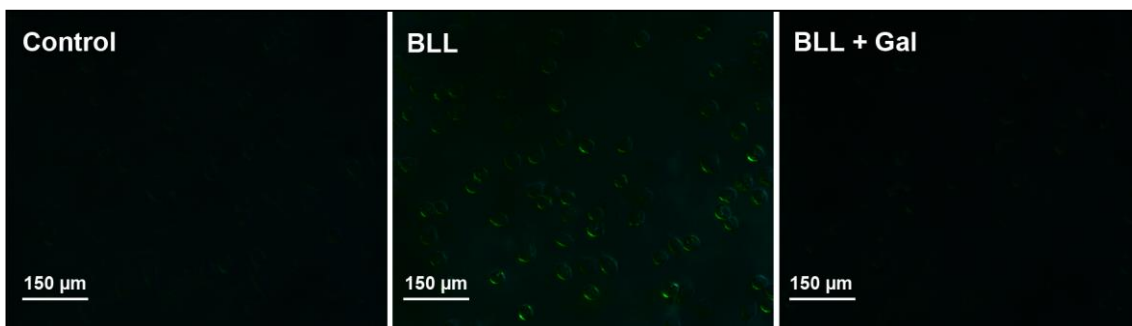


Figura 21- Presença de fibras amiloide-*like* no interior de macrófagos.

Fonte: A autora.

Legenda: Macrófagos foram incubados com BLL em meio RPMI na presença ou ausência de galactose (200 mM). A birrefringência do Vermelho do Congo indicativa da marcação de fibras amiloides (verde maçã) foi observada na membrana e no interior dos macrófagos.

Afim de compreender o mecanismo de entrada destas estruturas amiloide-*like* derivadas de BLL no interior de macrófagos peritoneais, as células foram concomitantemente tratadas com BLL e BLL+galactose; ou ainda pré tratadas por 30 min. com o 3-MA (conhecido inibidor de formação de vesículas autofágicas) ou Citocalasina B (inibidor de fagocitose) e posteriormente incubadas por 24h com BLL em meio RPMI, 37 °C. Ao final dos tratamentos mencionados, as células foram marcadas com Tioflavina S, montadas e analisadas por microscopia confocal.

Como esperado, na figura 22 demonstramos que nenhuma marcação significativa pode ser observada nas células controle sem nenhum tratamento ou BLL+galactose. No entanto, o tratamento prévio com citocalasina B, visivelmente levou a inibição da entrada dos agregados fibrilares para o citosol dos macrófagos. Tal resultado sugere que provavelmente a entrada das fibras amiloide-*like* derivadas de BLL no interior de macrófagos se dá através do processo de fagocitose.

Para verificarmos se o processo de agregação amiloide estaria acontecendo no interior dos macrófagos após a fagocitose da BLL foi realizado um ensaio de imunocitoquímica utilizando um anticorpo anti-fibras amiloides revelado por um anticorpo secundário conjugado a nanopartícula de ouro coloidal.

Figura 22 - Fibras amiloide-*like* derivadas de BLL são internalizadas por fagocitose.



Fonte: A autora.

Legenda: Macrófagos foram incubados com BLL em meio RPMI na presença ou ausência de galactose, 3-MA ou CytB. As marcações com ThS (verde) e Hoechst 33342 (azul) demonstram a localização dos depósitos de estruturas amiloide-*like* intracelulares e núcleo, respectivamente.

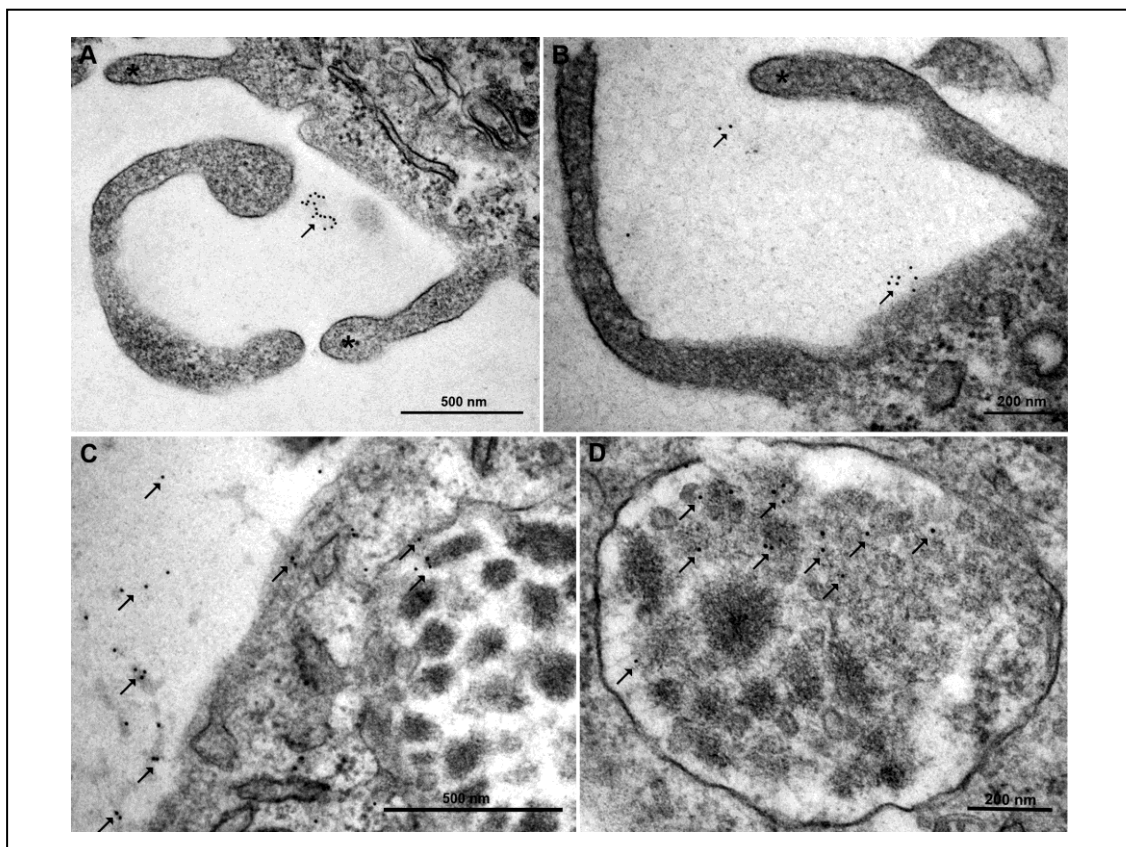
Nossos resultados demonstraram a presença de marcação positiva tanto para material fibrilar extracelular, quanto encontrado em compartimentos intracelulares (Figura 23). Além disso, também é possível observar nas imagens, projeções na membrana plasmática dos macrófagos tipicamente relacionadas ao processo de fagocitose (Figura 23 B e C). Estes dados corroboram os achados na condição de inibição da fagocitose com citocalasina B, indicando que as fibras amiloide-*like* derivadas de BLL são eficientemente fagocitadas pelos macrófagos e se acumulam em vesículas no interior destas células.

5.3.4 Fagocitose de estruturas amiloide-*like* derivados de BLL e a modulação da resposta imune em macrófagos

Como vimos anteriormente nos tópicos 5.1 e 5.2, BLL apresentou efetiva atividade leishmanicida contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum*. Além disso, nossos dados demonstraram que BLL foi capaz de inibir a infecção e sobrevivência de formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Tal atividade está fortemente relacionada à capacidade de modulação diferencial da resposta imune de macrófagos infectados com as espécies supracitadas. Portanto, a ciência da natureza fibrilar amiloide-*like* que é assumida por BLL quando incubada em meio RPMI (mesma condição de tratamento das formas amastigotas) embasou nossa hipótese de que as fibras amiloide-*like*, e não a lectina *per se*, estaria

levando à modulação da resposta imune dos macrófagos e poderia, desta forma, ser indiretamente responsáveis pela atividade sobre amastigotas intracelulares descrita no item 5.1 deste capítulo.

Figura 23- Imunocitoquímica de estruturas amiloide-like derivadas BLL em macrófagos peritoenais.



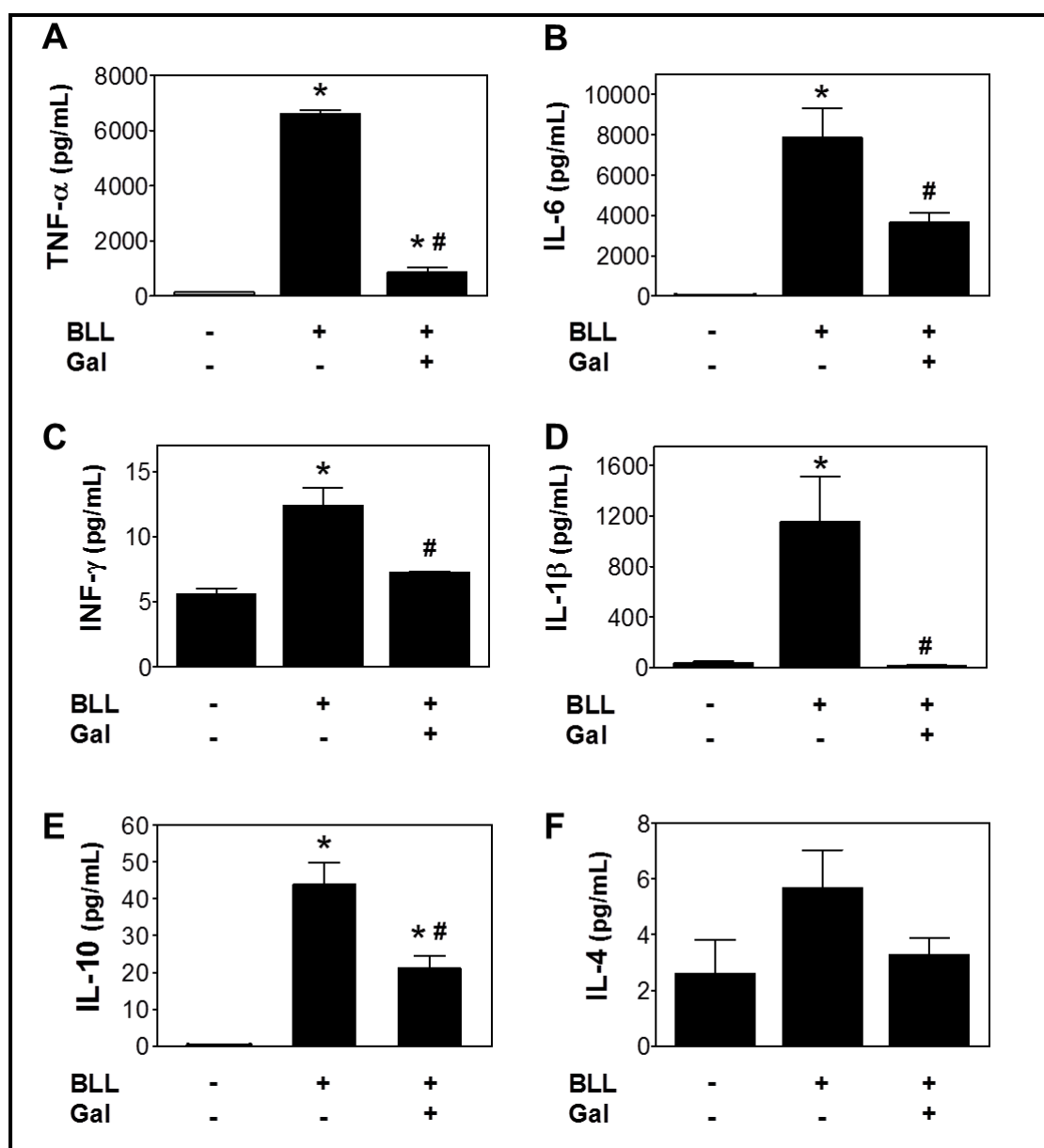
Fonte: A autora.

Legenda: Micrografias representativas de macrófagos tratados com BLL e imunomarcados com anticorpo primário anti-fibras amiloides LOC e anticorpo secundário conjugado a nanopartícula de ouro (10 nm). (A-B) Detalhe para a marcação de estruturas fibrilares extracelulares (setas) e pseudópodes (*). Note em (C) a presença de marcação positiva para estruturas fibrilares na superfície celular. (D) Presença de marcação positiva no interior de vacúolos intracelulares contendo material fibrilar.

Para avaliarmos se as fibras amiloide-like, e não somente a lectina em sua conformação nativa, estariam levando à modulação da resposta imune dos macrófagos foi realizada a análise do perfil de citocinas no sobrenadante de macrófagos incubados com BLL em meio RPMI a 37 °C. Nossos resultados demonstraram que houve um aumento significativo na secreção das citocinas próinflamatórias IL-1 β , TNF- α , IL-6 e INF- γ quando comparamos com a secreção das células controle não tratadas (Figura 24). Dentre as citocinas regulatórias testadas, somente a IL-10 apresentou aumento significativo (Figura 24 E). Por fim, a modulação da resposta imunológica de macrófagos também foi avaliada com a incubação com BLL na presença de galactose e nas mesmas condições

descritas anteriormente. Como era esperado, na presença de galactose (portanto, ausência de formação fibrilar amiloide-like derivada de BLL) houve uma redução significativa na modulação da resposta imune destas células, com valores aproximados aos encontrados nos sobrenadantes das células controle sem tratamento.

Figura 24 - Efeito das fibras amiloide-like derivadas de BLL sobre a secreção de citocinas em macrófagos.



Fonte: A autora.

Legenda: Os valores são representativos de média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. (*) Diferença significativa em relação ao controle não tratado.

6 DISCUSSÃO

A interação entre lectinas e carboidratos específicos está relacionada a diversos processos biológicos como o de reconhecimento, interação célula hospedeira-patógeno,

diferenciação celular e resposta imune. Neste sentido, a compreensão da natureza destas interações é essencial para elucidação das funções biológicas desencadeadas a partir deste reconhecimento, trazendo novas e mais abrangentes perspectivas na pesquisa nas áreas de imunologia, desenvolvimento de drogas e diagnóstico.

Neste trabalho nós investigamos a atividade biológica da lectina BLL sobre diferentes espécies de *Leishmania*, bem como sobre a interação de destes parasitos em modelo *in vitro* de infecção de macrófagos peritoneais de BALB/c e, por fim, o efeito direto da lectina sobre as células hospedeiras não infectadas. Para tal, primeiramente foi avaliado o potencial leishmanicida sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, agentes etiológicos da leishmaniose cutânea no Brasil. Nossos resultados demonstraram que BLL levou à inibição do crescimento e viabilidade de fomas promastigotas nas duas espécies, se deu de maneira dose e tempo dependente. Outros trabalhos demonstraram que lectinas podem ser capazes de inibir o crescimento de patógenos levando à morte celular por mecanismos não completamente elucidados (FERNANDES et al., 2010; BELO et al. 2017). Por outro lado, modelos celulares que não expressem determinados carboidratos aparentemente poderiam ser refratários ao efeito citotóxico desencadeado pelo tratamento com lectinas (FERNANDES et al., 2014). Naderer e colaboradores (2004) demonstraram que o glicocálix de formas promastigotas de *Leishmania* é rico em glicoconjugados contendo resíduos de galactosídeos. Sendo a BLL uma lectina com alta afinidade para galactose, o efeito leishmanicida da lectina poderia estar intimamente relacionado ao reconhecimento deste glicídeo na membrana do parasito. Neste sentido, demonstramos que o efeito leishmanicida foi completamente abolido quando formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* foram submetidas à incubação com BLL na presença de galactose. Levando-se em consideração que a BLL é uma proteína do tipo-C que requer a presença de íons de cálcio para a interação lectina-carboidrato nós verificamos que o EGTA, conhecido quelante de cálcio, também reverteu o efeito deletério da BLL sobre estes parasitas. Apesar da membrana do parasito ser o primeiro alvo de ligação das lectinas, a possibilidade de interação de BLL com componentes intracelulares não pode ser descartada. Fernandes e colaboradores (2014) demonstraram que a lectina Cramoll1,4, após se ligar à membrana de *Trypanosoma cruzi*, foi internalizada e aparentemente acumulada na mitocôndria deste parasito, afetando a função desta organela e desencadeando o processo de morte celular por necrose. Nossos resultados demonstraram que tanto o potencial de membrana mitocondrial, bem como a produção de ATP foram inibidos em formas promastigotas de

Leishmania tratadas com BLL. Como era esperado, tal efeito deletério a bioenergética mitocondrial do parasito não foi observado quando a incubação com BLL se deu na presença de galactose.

Os ensaios para avaliação da citotoxicidade evidenciaram que BLL não apresentou efeito significativo sobre macrófagos, principais alvos celulares de *Leishmania* spp. Corroborando nossos dados, outros estudos demonstraram que as lectinas podem exercer efeito leishmanicida sem apresentar qualquer efeito danoso às células do hospedeiro (ALCOLEA et al., 2014; CASTANHEIRA et al., 2013; JEBALI et al., 2014). A baixa citotoxicidade sobre macrófagos somada à alta seletividade sobre as formas promastigotas foi a base para prosseguirmos na investigação do efeito de BLL sobre a forma intracelular amastigota, de grande relevância por ser responsável pelas manifestações clínicas no hospedeiro vertebrado (KIMA, 2014). Os resultados obtidos mostram uma diminuição significativa da sobrevivência destes parasitos intracelulares após a incubação com BLL. Além disso, o tratamento com BLL também levou à diminuição significativa na porcentagem de macrófagos infectados com *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. No entanto, as duas espécies responderam diferencialmente ao tratamento com BLL na presença de galactose ou EGTA. Enquanto, o efeito inibitório de BLL sobre *L. amazonensis* foi mantido mesmo na presença do carboidrato ligante ou do quelante de íons de cálcio, a sobrevivência de *L. amazonensis* apresentou níveis semelhantes aos do controle sem tratamento. Estes dados sugerem que o efeito de *L. amazonensis* é dependente da interação da lectina com carboidratos de membrana da célula hospedeira ou mesmo da membrana do parasito intracelular.

A análise através de microscopia eletrônica de transmissão corroborou nossos resultados, evidenciando os efeitos deletérios de BLL sobre as formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, bem como a manutenção da viabilidade das células hospedeiras. Além disso, podemos observar que a incubação com BLL desencadeou uma inibição na exocitose de vesículas a partir dos amastigotas intracelulares de ambas as espécies testadas. Vesículas extracelulares (VEs) em parasitos do gênero *Leishmania* apresentam um papel essencial na troca de informações entre o patógeno e a célula infectada, atuando como mediadores capazes de suprimir o poder de resposta da célula hospedeira, facilitando a infecção e manipulação da resposta imune do hospedeiro (BELO et al., 2017). Outros estudos observaram que a secreção de exossomos ou outros tipos de VEs em *L. donovani* e *L. mexicana* tem função essencial no mecanismo de imunomodulação e desenvolvimento da infecção intracelular (ESCALONA-

MONTAÑO et al., 2016; SILVERMAN; REINER, 2011). Além disso, outros autores relataram que VEs podem estar intimamente relacionadas ao favorecimento de uma resposta pró-inflamatória na célula hospedeira. Silverman e Reiner (2011) demonstraram ainda que, nos estágios iniciais da infecção com *L. donovani*, o estímulo na liberação de VEs e/ou exossomos por estes parasitos estaria diretamente relacionado ao aumento na secreção de citocinas por células imunocompetentes. Portanto, a inibição da secreção de VEs por amastigotas intracelulares tratados com BLL nos abriu a possibilidade de que o efeito da lectina poderia estar associado a modificações na resposta imune da célula hospedeira infectada.

Os macrófagos, principal alvo da infecção por *Leishmania*, são células fagocíticas capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* “PAMP”) através do reconhecimento de receptores específicos, como por exemplo receptores do tipo Toll ou NOD, levando à liberação de mediadores da inflamação como espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* “ROS”) e de nitrogênio (i.e. NO), bem como citocinas pró-inflamatórias (IBRAHIM et al., 2013, LU e HUANG, 2017). Tais mediadores são responsáveis pelo *clearance* da infecção parasitária e pelo desenvolvimento da resposta adaptativa no hospedeiro infectado. Paradoxalmente, as respostas inata e adaptativa geradas com intuito de combater a infecção parasitária podem acabar ocasionando algumas das características da patogênese da leishmaniose, tais como destruição tecidual, agravando ainda mais a condição do hospedeiro infectado (ROSSI; FASEL, 2017). A dicotomia existente entre a resistência e a susceptibilidade à infecção tem encorajado a investigação de novas alternativas terapêuticas que atuem debelando o microorganismo infectante ao mesmo tempo em que exerçam atividade imunomodulatória sobre o hospedeiro. Desta forma, o efeito poderá ser direcionando à resposta imune para o controle da infecção sem que passe pelos efeitos deletérios sobre o tecido afetado (ALVES et al., 2017).

Apesar do reconhecido potencial imunomodulador das lectinas, poucos estudos se aprofundaram a respeito da capacidade destas proteínas em estimular a resposta de células imunocompetentes no combate à infecção por *Leishmania*. Neste sentido, seguimos com a investigação do efeito de BLL sobre a produção de NO e citocinas por células infectadas com *Leishmania*. Nossos dados demonstraram que a incubação com BLL induziu mudanças significativas no perfil de citocinas secretadas, bem como na produção de NO em macrófagos submetidos à infecção com *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Salvo as particularidades no perfil de resposta imune encontrado para cada espécie testada, de

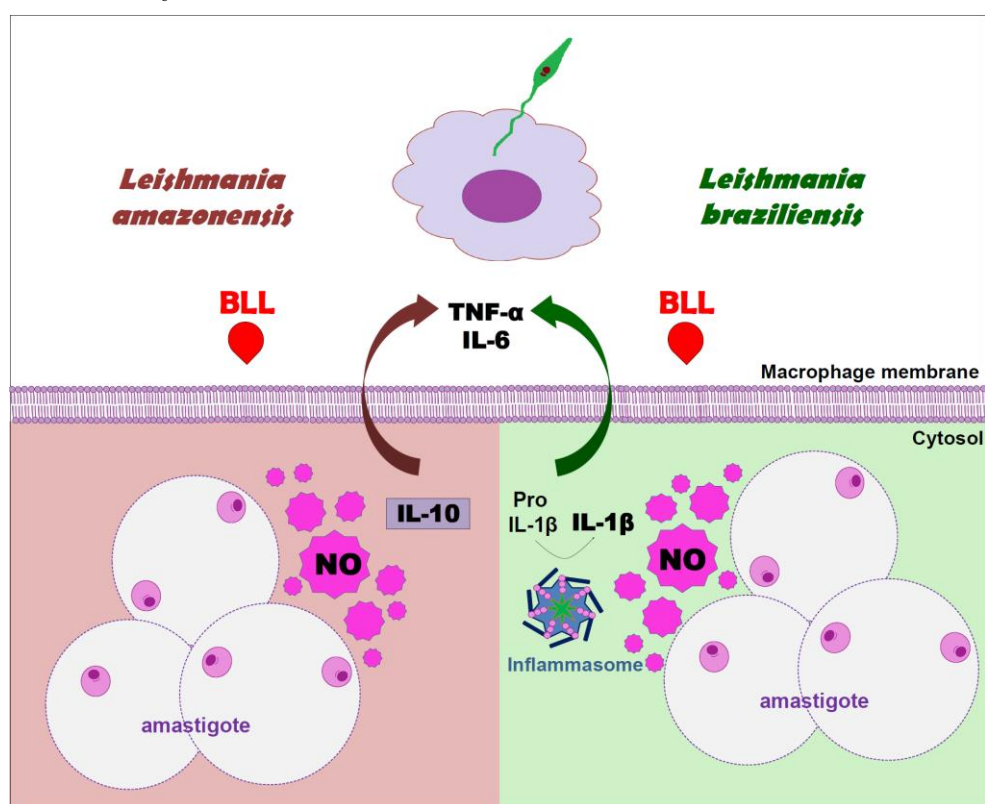
maneira geral, o tratamento com BLL induziu nos macrófagos infectados uma resposta essencialmente pró-inflamatória. Tal resposta caracterizou-se pelo incremento na secreção de NO, IL-6 e TNF- α . O fator de necrose tumoral (TNF- α) é frequentemente associado à resistência da célula hospedeira a vários microorganismos patogênicos, estimulando a liberação de NO (principal molécula microbicida produzida pelos macrófagos para combate a microorganismos patogênicos intracelulares) (FONSECA et al., 2003). Em adição, sabe-se que a secreção do TNF- α pode ser consequência da ativação do receptor do tipo Toll 2 (*Toll-like receptor 2* “TLR2”), desencadeando a sinalização para expressão de NF κ B, que culmina no aumento de citocinas pró-inflamatórias e atua como mecanismo de defesa contra a infecção contra *L. braziliensis* (IBRAIM et al., 2013; ASSIS et al., 2012). Em consonância com nossos dados, outras lectinas como a ArtinM, obtida a partir de sementes de *Artocarpus heterophyllus*, demonstrou capacidade de se ligar a TLR2 atuando como agonista na modulação da resposta imune celular (RICCI-AZEVEDO et al, 2016).

Apesar das semelhanças, a resposta de macrófagos à infecção com *L. amazonensis* e *L. braziliensis* apresentou grandes diferenças no que concerne à produção das interleucinas IL-1 β e IL-10. Em macrófagos infectados com *L. amazonensis* e submetidos à incubação com BLL, observou-se uma inibição significativa nos níveis na secreção de IL-1 β com aumento na produção de IL-10. Por outro lado, os níveis da citocina regulatória IL-10 permaneceram inalterados nos sobrenadantes de macrófagos infectados com *L. braziliensis* e posteriormente tratados com BLL. Nestas células, no entanto, houve um aumento acentuado na produção de IL-1 β nestas condições. A forma bioativa da IL-1 β é um produto da clivagem enzimática da forma inativa pro-IL-1 β pelo complexo multiproteico denominado inflamassomo NLPR3, o qual é descrito como peça essencial no combate a *L. donovani*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis* via indução de estresse oxidativo (DIXIT, 2014; LIMA-JUNIOR et al, 2017). A produção acentuada desta citocina pode ter contribuído para o decréscimo no índice de sobrevivência e porcentagem de macrófagos infectados com *L. braziliensis* posteriormente expostos a BLL. Nossos dados corroboram os encontrados por Ricci-Azevedo e colaboradores (2017) os quais demonstraram que o tratamento de neutrófilos com a lectina ArtinM promove a inibição de formas patogênicas de *L. major* através de um mecanismo que inclui o incremento na secreção de IL-1 β e outras citocinas pró-inflamatórias.

Contrariamente ao observado em *L. braziliensis*, os níveis de IL-1 β nos sobrenadantes de células infectadas com *L. amazonensis* submetidas a tratamento com

BLL foram significativamente inferiores aos valores encontrados para o controle infectado sem tratamento. Porém, tal supressão não teve influência sobre o aumento na produção de NO que, por sua vez, pode ser explicado pela presença de outras citocinas pró-inflamatórias nestes sobrenadantes como IL-6 e TNF- α . Os níveis elevados da interleucina regulatória IL-10 poderiam ser responsáveis pelo decréscimo na secreção de IL-1 β , mitigando uma possível exacerbação da resposta pró-inflamatória e ampliando a possibilidade de proteção contra eventuais efeitos deletérios deste tipo de resposta nas células hospedeiras (Figura 25).

Figura 25 - Modelo esquemático do mecanismo de ação de BLL sobre macrófagos infectados com *L. amazonensis* e *L. braziliensis*.



Fonte: A autora.

Como o tratamento com BLL desencadeou uma resposta majoritariamente pró-inflamatória em macrófagos infectados por ambas as espécies testadas inicialmente e de IL-1 β para *L. braziliensis*, nossos resultados sugerem fortemente que receptores do tipo Toll ou NOD podem estar envolvidos no reconhecimento de BLL pela célula hospedeira. Os mecanismos de atuação de BLL sobre células infectadas pelas duas espécies causadoras da leishmaniose tegumentar parecem convergir para produção de NO e levar à inibição da sobrevivência do parasito intracelular. No entanto, resta ainda

compreender qual seria o efeito direto de BLL sobre *L. amazonensis* e *L. braziliensis* e mesmo se esse efeito se estenderia a outras espécies do gênero *Leishmania*.

Afim de avaliar se o potencial leishmanicida de BLL também se estenderia a outras espécies de *Leishmania*, conduzimos a avaliação do potencial leishmanicida em *L. infantum*, agente da leishmaniose visceral. Da mesma forma que em *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, a BLL induziu uma diminuição tempo e dose dependente da formas promastigotas de *L. infantum*. Ainda corroborando nossos dados, a atividade sobre o parasito demonstrou estar associada ao aumento de espécies reativas de oxigênio citosólico e diminuição do potencial de membrana mitocondrial. Dentro desta temática, diversos trabalhos, envolvendo o estudo do mecanismo de ação de lectinas sobre diversos modelos celulares tem demonstrado que, após a ligação a receptores de membrana, estas proteínas podem ser internalizadas por endocitose e posteriormente se acumular preferencialmente na mitocôndria destas células (LEI; CHANG, 2007; LI et al., 2011). Outro estudo envolvendo tratamento de *T. cruzi* com lectinas demonstrou a localização de Cramoll1,4 na mitocôndria do tripanossomatídeo, sendo a desregulação na homeostase da produção de ATP e a perda no potencial de membrana mitocondrial apontadas como via clássica de morte celular nestes parasitos (FERNANDES et al., 2014).

A eficiência das poucas drogas utilizadas atualmente na terapêutica da leishmaniose é limitada principalmente pela alta toxicidade, custos e resistência ao tratamento. Novas abordagens se tornam cada vez mais urgentes, no entanto, também é necessário que se alcance níveis mais profundos no conhecimento dos alvos de ação celulares e moleculares destas terapias emergentes. Neste sentido, prosseguimos nossos estudos induzindo a resistência ao tratamento com BLL em uma linhagem de promastigotas de *L. infantum* transfectada com cosmídeos que promovem resistência aos fármacos mais utilizados na terapia da leishmaniose, como Antimoniais e Anfotericina B. Neste estudo, utilizamos a técnica de *Cosmid Sequencing (Cos-Seq)* para avaliar a amplificação dos cosmídeos de resistência, identificar potenciais alvos da ação leishmanicida e genes responsáveis pela resistência induzida ao tratamento com BLL. No entanto, a maior limitação desta técnica é a incapacidade de detectar alvos não proteicos ou mesmo de identificar regiões completas onde ocorre a *overexpression* de genes ligados à toxicidade (GANAZION et al., 2016). A baixa quantidade de genes relacionados à resistência ao tratamento explica a grande dificuldade em desenvolver estas culturas resistentes e corroboram nossos resultados que demonstram a eficiência do efeito de BLL sobre formas promastigotas nas 3 linhagens testadas. Aparentemente haveria poucos

alvos de indução de resistência ao tratamento com BLL em *Leishmania*, o que explicaria a dificuldade em identificar genes de resistência por *Cos-Seq*. Contudo, em meio à escassez de genes encontrados, foram identificados quatro alvos de ação leishmanicida reconhecida.

Modificações em proteínas presentes na membrana do parasito, como as Tryparedoxinas (TXNPx) poderiam estar associadas à resistência ao tratamento com BLL. Nossos resultados indicam um maior enriquecimento de cosmídeos de resistência relacionados à TXNPx, provavelmente em resposta ao estresse oxidativo mitocondrial. Neste sentido, Das e colaboradores (2017) demonstraram que o tratamento com Miltefosina levou à superexpressão de TXNPx em *Leishmania donovani*, atenuando a proteção contra o estresse exógeno e estimulando a superexpressão da TXNPx mitocondrial. Além disso, diversos estudos observaram que outros mecanismos, incluindo o aumento de tióis e a superexpressão de enzimas envolvidas no metabolismo tiol, como ornitina descarboxilase, tripanotio redutase, triparedoxina mitocondrial e triparedoxina peroxidase, podem contribuir para a resistência como mecanismos de desintoxicação de drogas (ALCOLEA et al., 2016; SINGH et al., 2017). Por outro lado, sabe-se ainda que certas proteínas envolvidas na resistência ao estresse oxidativo e nitrosativo são mais abundantes nos últimos estágios de crescimento e diferenciação em formas promastigotas de *L. amazonensis*. O aumento na expressão de proteínas como a arginase, uma variante leve da triparedoxina peroxidase, a superóxido de ferro dismutase, a subunidade reguladora da proteína quinase A e uma variante leve da HSP70, são tipicamente relacionadas à fase pré-adaptativa de preparação para o estágio de amastigota, por conseguinte, relacionadas com a infectividade do parasito (GOMEZ-PÉREZ et al., 2016; SARAVANAN e DAS, 2018). Além disso, os dados encontrados em nossas análises claramente podem ser apontados como responsáveis pelo desenvolvimento da resistência do parasito ao tratamento com BLL, justamente por estarem concomitantemente relacionados a processos de morte celular (GANAZION et al., 2016).

A relevância dos nossos achados na atividade leishmanicida para as espécies testadas neste trabalho nos encaminhou para a investigação do efeito direto de BLL sobre a célula hospedeira do parasito. Macrófagos são células imunocompetentes do sistema imunofagocítico que podem ter a sua função de defesa estimulada por organismos potencialmente patogênicos ou mesmo outros estímulos não biológicos. A observação por MET de macrófagos peritoneais submetidos ao tratamento com BLL, apesar de não

demonstrar efeito citotóxico, revelou a presença de numerosas vesículas contendo material eletrondenso com aspecto fibrilar.

Estudos anteriores demonstraram que, quando incubada em meio de cultivo celular a 37°C, a lectina Concanavalin A (ConA) perde sua estrutura nativa dando início a um processo de agregação amiloide (VETRI et al., 2010; VETRI et al., 2011). Além disso, Nunes e colaboradores (2011) demonstraram que BLL é uma proteína com estrutura secundária composta essencialmente por β -folhas, a qual é favorável à formação de agregados do tipo amiloide (NOWICK, 2008). Neste sentido, também já foi descrito que, após irradiação do tipo gama, a estrutura da lectina BLL não pode ser convertida em agregados, perdendo a capacidade de aglutinar eritrócitos (NUNES et al., 2012). No entanto, a natureza destes agregados, bem como o estado conformacional e atividades biológicas de BLL neste estado, permanecem desconhecidos.

Para investigar se haveria formação de agregados amiloides, a lectina BLL foi incubada em meio de cultivo RPMI, a 37°C, CO₂ 5% (mesmas condições utilizadas no cultivo de macrófagos). A presença de fibras amiloides foi monitorada através da medida de fluorescência de thioflavina T e de absorvância do vermelho do Congo, ambos corantes comumente utilizados na detecção de agregados amiloides com alto grau de afinidade pelas estruturas em β -folhas, típicas destas conformações proteicas (CHITI; DOBSON, 2017). Nossos resultados sugerem fortemente que BLL é capaz de originar a formação de agregados amiloide-*like* quando incubada em meio RPMI sob “condições fisiológicas”. No entanto, a formação destes agregados foi abolida quando a lectina foi incubada em meio sob as mesmas condições, mas na presença do carboidrato ligante, galactose. Estes achados sugerem que talvez a conservação do sítio de ligação da proteína tenha relevância sobre o desencadeamento do processo de agregação de BLL.

Diversos estudos demonstraram que a fagocitose de fibras amiloides A β é sensivelmente afetada em pacientes diagnosticados com Mal de Alzheimer, tal descréscimo leva ao acúmulo destes agregados no tecido cerebral, ocasionando uma piora no quadro clínico destes indivíduos (GUILLOT-SESTIER et al., 2016; JONES et al., 2014; MIZWICKI et al., 2012). Os agregados amiloides derivados da lectina ConA também apresentaram efeito deletério a viabilidade celular, exercendo atividade citotóxica sobre células de neuroblastoma (VETRI et al., 2010). No entanto, a citotoxicidade de ConA foi associada à presença significativa de oligômeros, fase precursora da agregação amiloide e conhecidamente tóxica às células eucarióticas. Nossos achados, no entanto, demonstraram não haver presença significativa de

oligômeros derivados de BLL mesmo em tempos curtos de incubação em condições fisiológicas, como podemos observar através da MET.

Com a finalidade de compreender como se daria o mecanismo de ação das estruturas amiloide-*like* derivados de BLL sobre macrófagos peritoneais primários, prosseguimos com a investigação sobre o processo de internalização desses agregados. Neste sentido, Takahashi e colaboradores (1989) observaram que fibras amiloides poderiam ser formadas no interior de macrófagos ou mesmo fagocitadas por estas células. Nossos dados demonstraram que a inibição da formação de autofagossomos não interferiu na presença de estruturas amiloide-*like* no interior de macrófagos incubados com BLL. No entanto, o inibidor de fagocitose inibiu fortemente a presença destes agregados no citosol dos macrófagos. Tais achados embasaram a hipótese de que provavelmente as estruturas amiloide-*like*, visualizadas no interior dos macrófagos após 24 h de incubação em meio RPMI a 37°C, teriam sido internalizadas já sobre a forma de agregados amilóides, por meio de um processo de fagocitose. O estudo ultraestrutural utilizando a técnica de imunocitoquímica corroborou nossos dados, mostrando marcação positiva para proteína amilóide no meio extracelular, bem como a formação de projeções da superfície celular semelhantes a pseudópodos, caracterizando a fagocitose como via de entrada das estruturas amiloide-*like* derivados de BLL em macrófagos peritoneais.

Em relação ao papel da fagocitose na eliminação de estruturas amiloides, estudos anteriores demonstraram que efeitos deletérios a macrófagos e micróglia (células capazes de desempenhar as mesmas funções que os macrófagos, incluindo fagocitose e secreção de citocinas) podem ter influência direta na progressão da doença de Alzheimer (AARON; MCLAURIN, 2012). Para esclarecer se a fagocitose de estruturas amiloide-*like* derivadas de BLL teria efeito sobre a função imunológica destas células, analisamos o perfil de citocinas produzidas nas condições descritas anteriormente. Desta forma, observamos um aumento significativo na secreção das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-6 e INF- γ , quando comparamos com o quantitativo produzido no controle sem tratamento.

Estudos anteriores demonstraram que modificações estruturais na bothropstoxin-1 (componente da peçonha de *Bothrops jararacussu*) podem originar agregados proteicos e oligômeros relacionados com o estímulo da resposta pró-inflamatória em macrófagos (CAPRONI et al., 2009). Além disso, outros autores ainda sugerem que a expressão aumentada de IL-6 em modelos de camundongos teve ação efetiva na prevenção da deposição de placas amiloides. Este efeito foi associado à regulação positiva de

marcadores de fagocitose *in vivo*, bem como aumento da fagocitose de agregados amiloides *in vitro* (CHAKRABARTY et al., 2010; VERBEECK et al., 2017). A presença de agregados amiloides-*like* também está relacionada ao aumento na produção de TNF- α , promovendo a migração de populações de células relacionadas à resposta proinflamatória e diretamente envolvidas na eliminação destes agregados.

Em processos patológicos associados à deposição de agregados amiloides, como o mal de Alzheimer, há um aumento na secreção da interleucina 1- β na região cerebral (HALLE et al., 2008; OLESZYCKA et al., 2016). A IL-1 β pode ser produzida pelas células da micróglia, podendo ser superexpressa em casos de deposição de placas de agregados A β , especialmente nos pacientes acometidos pelo Mal de Alzheimer (HALLE et al., 2008). Esta citocina é produzida no citosol, em sua forma inativa pro-IL-1 β , após ativação celular que pode se dar por diversos estímulos, inclusive a presença de agregados amiloides. A clivagem enzimática da pro-IL-1 β , gerando a forma ativa de IL-1 β , é dependente do recrutamento da caspase-1, originando um complexo multiproteico denominado inflamassomo. Desta forma, a família de complexos citosólicos proteicos denominados *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor* (NLR) está associada a regulação do processo de ativação de IL-1 β . Um dos inflamassomos mais estudados é o NLRP3, que pode ser ativado por estímulos microbicidas ou não microbicidas (LAMKANFI et al., 2014). O aumento na secreção de IL-1 β em macrófagos tratados com BLL sugere que os agregados amiloide-*like* derivados da lectina podem estimular a ativação do inflamassomo NLRP3 via reconhecimento de receptor do tipo Toll (OLESZYCKA et al., 2016). Neste sentido, sabemos ainda que amiloides de origem bacteriana podem promover a ativação do inflamassomo NLRP3, via ativação do heterocomplexo TLR2/TLR1, levando ao aumento na fagocitose dos agregados, ativação de NF- κ B e, por fim, expressão de citocinas proinflamatórias como IL-1 β e IL-6 (RAPSINSKI et al., 2015). O aumento na produção de IL-1 β observado em nosso estudo sugere que BLL poderia ativar o inflamassoma NLRP3 via reconhecimento de receptor do tipo Toll. Além disso, estudos prévios demonstraram que outras lectinas como a cMoL (lectina coagulante de *Moringa oleífera*) e WSMoL (lectina de *Moringa oleífera* solúvel em água), ambas purificadas a partir da semente de *Moringa oleífera*, apresentaram diferentes vias de modulação sobre a produção de IL-1 β (ARAÚJO et al., 2013).

Na incubação simultânea com BLL e galactose não foi observado aumento significativo de citocinas quando comparados ao controle sem tratamento. Como demonstrado, a presença da galactose inibe a formação de agregados amiloide-*like*

derivados de BLL. Tais resultados sugerem que o estado de agregação da lectina é relevante para o reconhecimento e internalização destas estruturas pelos macrófagos e, conseqüentemente, levam à produção de resposta próinflamatória.

Nossos resultados apresentam um importante "*insight*" a respeito das estruturas amiloide-*like* derivadas de BLL sobre a resposta imune de macrófagos, inclusive nas condições de infecção com *Leishmania*. O entendimento do processo de formação dos agregados amiloide-*like* derivados de BLL poderá servir de modelo não somente para a resposta imune induzida por amiloides, mas também para a compreensão de mecanismos de fagocitose de estruturas amiloides e de combate à infecção parasitária. Vale ainda salientar que BLL é uma biomolécula ativa com diversas funções atribuídas a ela em testes realizados sob condições similares as utilizadas no presente estudo (ARANDA-SOUZA et al., 2014; NUNES et al. 2012).

Como foi demonstrado, nas condições testadas, BLL sofre processo de agregação originando fibras amiloide-*like* que possivelmente participam do reconhecimento de receptores do tipo Toll ou outros receptores de membrana celular, sendo eficientemente fagocitadas por macrófagos peritoneais. Uma vez interiorizadas, a lectina (agora na forma de agregado amiloide) pode levar à ativação de inflamassomo, induzindo a geração de resposta de próinflamatória. O estado conformacional amiloide de BLL pode também estar relacionado com a atividade antimicrobiana, antitumoral (NUNES et al., 2011; NUNES et al, 2012a; NUNES et al 2012b; ARANDA-SOUZA et al., 2014), descritos em trabalhos do nosso grupo de pesquisa, e antileishmania (ARANDA-SOUZA et al., 2018), apresentado nesta tese. Além disso, a intensificação do processo de fagocitose, bem como o estímulo da secreção de citocinas próinflamatórias em macrófagos, abre novas perspectivas a respeito do mecanismo de ação de lectinas, bem como seus prováveis derivados amiloides, como modelo terapêutico no tratamento e atenuação da leishmaniose tegumentar e visceral e, por fim, na prevenção de doenças relacionadas ao acúmulo de agregados amiloides.

7 CONCLUSÕES

- a) A lectina BLL possui atividade sobre o crescimento e viabilidade em formas promastigotas de *L.amazonensis*, *L. braziliensis* e *L.infantum*, através de mecanismos que afetam a morfologia e fisiologia mitocondrial;
- b) A reversão dos efeitos deletérios da BLL sobre forma promastigotas de *L.braziliensis* e *L. amazonensis* pela incubação simultânea com EGTA e galactose, demonstra que a atividade desta proteína sobre esta forma evolutiva é dependente tanto ligação ao açúcar específico para lectina e de Cálcio.
- c) A baixa citotoxicidade da BLL em células de mamífero e a alta atividade desta proteína contra os parasitas, culminou em altos índices de seletividade, mostrando que a BLL é mais seletiva para *Leishmania* spp. do que para célula do hospedeiro.
- d) As severas alterações ultraestruturais induzidas por BLL corroboram o efeito deletério desta lectina sobre a viabilidade, proliferação de formas promastigotas e amastigotas e aponta a mitocôndria como uma das organelas alvos de ação da BLL em *Leishmania* spp.
- e) O baixo enriquecimento de cosmídeos relacionados à resistência ao tratamento com BLL em promastigotas de *L. infantum* pode indicar a alta seletividade da lectina sobre alvos diretamente ligados a processos de morte celular e relacionados a alterações de membrana plasmática e estresse oxidativo mitocondrial;
- f) A incubação simultânea de BLL e Galactose afeta diferentemente a viabilidade de formas amastigota e a infecção em macrófagos peritoneais, sugerindo que pelo menos para *L. amazonensis* o efeito inibitório da BLL não depende da ligação da lectina a resíduos de galactose presentes na superfície da amastigota ou da célula hospedeira.
- g) Tendo em vista que vesículas exossomais são importantes fatores de patogenicidade em *Leishmania* spp., A inibição da secreção destas estruturas em amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* tratadas com BLL pode estar associada com as modificações na resposta imune observadas neste estudo.
- h) Nossos resultados mostraram que o tratamento de BLL em células não infectadas e infectadas por *L. braziliensis* e *L. amazonensis* leva a um aumento na produção de citocinas próinflamatórias e de NO em macrófagos não infectados, evidenciando o papel imunomodulador desta lectina, sendo esta resposta estritamente modulada na presença da infecção;

- i) A BLL é capaz de formar estruturas semelhantes a agregados amiloides em meio de cultivo como demonstrado pela marcação com tioflavina, vermelho do congo e análises ultraestruturais.
- j) A formação de agregados semelhantes a amiloides em BLL e a fagocitose destas estruturas é afetada pela presença da galactose;
- k) O tratamento de macrófagos com 3-MA e CytB inibidores de vesículas autofágicas e da fagocitose, respectivamente indicam que estruturas semelhantes a agregados amiloides são formados extracelularmente e eficientemente fagocitados por macrófagos peritoneais de camundongo, sem afetar a viabilidade celular;
- l) O aumento na secreção de IL-1 β em macrófagos tratados com BLL sugere que os agregados semelhantes a amiloides derivados da lectina podem estimular a ativação do inflamassoma NLRP3 via reconhecimento de receptor do tipo Toll;
- m) Em conjunto, nossos resultados mostraram que a lectina do tipo-C BLL apresenta atividade leishmanicida e imunomoduladora sobre macrófagos infectados com diferentes espécies de *Leishmania* e é capaz de formar estruturas semelhantes a amiloides em meio de cultivo. O conhecimento a respeito das diferenças do efeito de BLL sobre cada espécie de *Leishmania*, bem como sobre as células hospedeiras, poderá trazer contribuições importantes para a descoberta de alvos terapêuticos inéditos contra *Leishmania* spp. Além do mais, a compreensão da natureza estrutural da BLL pode ser um modelo útil no estudo da resposta celular e imune de macrófagos em doenças relacionadas a deposição anormal de proteínas amiloides.

REFERÊNCIAS

- AARON, Y. L.; MCLAURIN, J. Clearance of amyloid- β peptides by microglia and macrophages: the issue of what, when and where. **Future Neurol.**, London, v.1; 7(, n.2):, p. 165–176, 2012.
- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **PLoS Negl Trop Dis.**, São Francisco, v. 10(, n. 3):e0004349, 2016. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004349>>. Acesso em: 20 janeiro de 2018.
- ALCOLEA, P.J. et al. An Insight into the proteome of *Crithidia fasciculata* choanomastigotes as a comparative approach to axenic growth, peanut lectin agglutination and differentiation of *Leishmania* spp. promastigotes. **PLoS One.** São Francisco, v. 9, n. (12): e113837, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25503511/>>. Acesso em: 20 janeiro de 2018.
- ALVES, M.M.M. et al. Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by *Leishmania major*. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, Hannover, v. 390, n.(9):, p. 893-903, 2017.
- AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and experimental dermatology**, Nova Iorque, v. 35, n. 7, p. 699-705, 2010.
- ARANDA-SOUZA, M.A. et al. A lectin from *Bothrops leucurus* snake venom raises cytosolic calcium levels and promotes B16-F10 melanoma necrotic cell death via mitochondrial permeability transition. **Toxicon.**, Oxford, v. 82:, p.97-103, 2014.
- ASLETT, M. et al. TriTrypDB: A functional genomic resource for the TTrypanosomatidae. **Nucleic Acids Res**, Oxford, v. 38, p.(Database issue):D D457–D462, 2010.
- ASSIS, R.R. et al. Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure. **PLoS Negl Trop Dis.** São Francisco, v. 6(, n.2):e1543, 2012.

- BANERJEE, A.; MANJARIKA, D.E.; ALI, N. Combination Therapy with Paromomycin-Associated Stearylamine-Bearing Liposomes Cures Experimental Visceral Leishmaniasis through Th1-Biased Immunomodulation. **Antimicrob Agents Chemother.**, Washington, v. 55, n.(4):, p. 1661–70, 2011.
- BARATTA-MASINI, A. et al. Mixed cytokine profile during active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance. **Front Biosci.**, Lausanne, v.1, n.(12):, p. 839-49, 2007.
- BARONDES, S.H. et al. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. **J Biol Chem.** São Francisco, v. 269 , n. (33):, p. 20807-10, 1994.
- BELO, R. et al. *Leishmania infantum* Exoproducts Inhibit Human Invariant NKT Cell Expansion and Activation. **Front Immunol.**, Lausanne, v. 8:, n. 710, 2017. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2017.00710/full>>
- BEMPORAD, F.; RAMAZZOTTI, M. From the Evolution of Protein Sequences Able to Resist Self-Assembly to the Prediction of Aggregation Propensity. **Int Rev Cell Mol Biol.**, London, v. 329:, p. 1-47, 2017.
- BENAIM, B.; GARCIA, C.R. Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas' disease and leishmaniasis - a review. **Trop Biomed.**, Kuala, v. 28, n.(3):, p. 471-81, 2011.
- BIRNBAUM, R.; CRAFT, N. Innate Immunity and Leishmania Vaccination Strategies. **Dermatol Clin.**, Toronto, v. 29:, p. 89–102, 2011.
- BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology.** Califórnia, v. 2, n. (10):, p. 907-6, 2001.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** London, v. 72:, p. 248-54, 1976.
- BRASIL. Secretaria de vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose

BRINGAUD, F.; RIVIEÈRE, L.; COUSTOU, V. Energy metabolism of trypanosomatids: Adaptation to available carbon sources. **Molecular and Biochemical Parasitology.**, Amsterdã, v. 149,, p. 1-9, 2006.

BUELL, A.K. The Nucleation of Protein Aggregates - From Crystals to Amyloid Fibrils. **Int Rev Cell Mol Biol.**, London, v. 329, p. :187-226, 2017.

CAPRONI, P. et al. Study of irradiated bothropstoxin-1 with ⁶⁰Co gamma rays: immune system behavior. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, São Paulo, v. 15, p. 216–225, 2009.

CARROTTA, R. et al. α -Casein inhibition mechanism in concanavalin A aggregation process. **J Phys Chem B.**, Washington, v. 116(, n. 50), p.: 14700-7, 2012.

CASTANHEIRA, L.E. et al. Biochemical and functional characterization of a C-type lectin (BpLec) from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Int J Biol Macromol.**, London, v. 54:, p. 57-64, 2013.

CASTELLUCCI, L. et al. Wound healing genes and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Infect Genet Evol.** v. 12:, p. 1102- e10, 2012.

CHAKRABARTY, P, et al. Massive gliosis induced by interleukin-6 suppresses A β deposition in vivo: evidence against inflammation as a driving force for amyloid deposition. **FASEB J.** Massachusetts, v. 24(, n. 2):, p. 548-59, 2010.

CHARMOY, M. et al. The Nlrp3 inflammasome, IL-1 β , and neutrophil recruitment are required for susceptibility to a nonhealing strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. **Eur J Immunol.**, Weinheim, v. 46, n.(4):, p. 897-911, 2016.

CHITI, F.; DOBSON, C.M. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. **Annu Rev Biochem.**, Palo Alto, v. 75:, p. 333–366, 2017.

CHOI, B.S.; KROPF, P. Evaluation of T cell responses in healing and nonhealing leishmaniasis reveals differences in T helper cell polarization ex vivo and in vitro. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 31, n. 4, p. 199-209, 2009.

CUMMINGS, R. D. Lectins as tools for glycoconjugate purification and characterization, in **Glycosciences: status and perspectives**. pp. 191-199, Chapman & Hall, Weinheim, 1997. Disponível em:

<<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527614738.ch10>> Acesso em: 20 janeiro de 2018.

CUMMINGS, R.D. T cells are Smad'ly in love with galectin-9. **Immunity.**, Cambridge, v. 41, n. (2):, p. 171-3, 2014.

CUNHA, M.A. et al. Efficacy and Safety of Liposomal Amphotericin B for the Treatment of Mucosal Leishmaniasis from the New World: A Retrospective Study. **Am J Trop Med Hyg.**, Arlington, v. 93, n.(6, p.):1214-8, 2015.

DANG, L.; VAN DAMME, E.J. Toxic proteins in plants. **Phytochemistry**, Uppsala,. v. 117:, p. 51-64, 2015.

DAS, S. et al. Functional Involvement of Leishmania donovani Tryparedoxin Peroxidases during Infection and Drug Treatment. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v.. 62(1). pii: e00806-17, 2017. Disponível em: <<https://aac.asm.org/content/62/1/e00806-17.long>> Acesso em: 20 janeiro de 2018.

DAVID, C.V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatol. Ther.**, London, v. 22, p.491-502, 2009.

DRICKAMER, K. Evolution of Ca²⁺-dependent animal lectins. **Progi: Nucleic Acid Res. Mol. Biol.**, London, v. . 45, p. 207-233, 1992.

DRICKAMER, K.; TAYLOR, M.E. Biology of animal lectins, **Annu. Rev. Cell Biol.**, Danvers, v. 9, p. 237-264, 1993.

EL-ON, J. Current status and perspectives of the immunotherapy of leishmaniasis. **Imaj.**, Tel Aviv, v. 11, n. 1, p.623-628, 2009.

ESCALONA-MONTAÑO, A.R. et al. *Leishmania mexicana*: promastigotes and amastigotes secrete protein phosphatases and this correlates with the production of inflammatory cytokines in macrophages. **Parasitology**. Cambridge, v. 143(, n. 11):, p. 1409-20, 2016.

- FEINBERG, H. et al. Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR. **Science.**, Washington, v. 294, n.(5549):, p. 2163-6, 2001.
- FERNANDES, M.P. et al. Mechanism of Trypanosoma cruzi death induced by Cratylia mollis seed lectin. **J. Bioenerg. Biomembr.**, Nova Iorque, v.42, n.(1):, p. 69-78, 2010.
- FERNANDES, M.P. et al. The Cratylia mollis Seed Lectin Induces Membrane Permeability Transition in Isolated Rat Liver Mitochondria and a Cyclosporine A-Insensitive Permeability Transition in Trypanosoma cruzi Mitochondria. **The Journal of Eukaryotic Microbiology (Online)**, London, v. x, p. 12118-4473, 2014.
- FIDALGO, L.M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. **Pharm Res.**, Arlington, v. 28, n.(11):, p. 2758-70, 2011.
- GABIUS, H.J. Glycobiomarkers by glycoproteomics and glycan profiling (glycomics): emergence of functionality. **Biochem Soc Trans.**, Portaland, v. 39, n.(1), p.: 399-405, 2011.
- GABIUS, H.J.; KAYSER, K. Introduction to glycopathology: the concept, the tools and the perspectives. **Diagn Pathol.**, London, v. 20:, n. 9:, p. 4, 2014.
- GAZANION, É. et al. Cos-Seq for high-throughput identification of drug target and resistance mechanisms in the protozoan parasite Leishmania. **Proc Natl Acad Sci USA.**, Washington, v. 113, n.(21):E, p. 3012-21, 2016.
- GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S.B. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochem.**, Amesterdã, v. 113, n. (3):, p. 236-47, 2011.
- GIUDICE, A. et al. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. **BMC Infectious Diseases.**, London, v. 75, n. (12): , p. 1-9, 2012.
- GOMES-SILVA, A. et al. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human Leishmania (Viannia) braziliensis infection? **Clin Exp Immunol.**, London, v. 149, n.(3):, p. 440-4, 2007.

GÓMEZ PÉREZ, V. et al. Decreased antimony uptake and overexpression of genes of thiol metabolism are associated with drug resistance in a canine isolate of *Leishmania infantum*. **Int J Parasitol Drugs Drug Resist.**, London, v. 6, n.(2):, p. 133-9, 2016.

GONZÁLEZ, U. et al. The cochrane collaboration: Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Barcelona: Wiley & Sons.** Barcelona, 2008.

GUILLOT-SESTIER, M.V.; WEITZ, T.M.; TOWN, T. Quantitative 3D In Silico Modeling (q3DISM) of Cerebral Amyloid-beta Phagocytosis in Rodent Models of Alzheimer's Disease. **J Vis Exp.**, Cambridge, v. 26, n. ;(118), 2016. Disponível em: <<https://www.jove.com/t/54868/quantitative-3d-silico-modeling-q3dism-cerebral-amyloid-beta>> Acesso em 8 de janeiro de 2018.

GUIMARÃES-GOMES, V. et al. Cloning, characterization, and structural analysis of a C-type lectin from *Bothrops insularis* (BiL) venom. **Arch Biochem Biophys.** Amsterdã, v. 432, n.(1):, p. 1-11, 2004.

HAAS, B.J. et al. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. **Nat Protoc**, London, v. 8, n.(8):, p. 1494–1512, 2013.

HALLE, A. et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. **Nat Immunol.**, London, v. 9, v.(8):, p. 857-65, 2008.

HERZIG H.P. et al. **Communications de la SSP. Progress in Physics (39).** Bloch meets Alzheimer (PDF Download Available). Disponível em: < Available from: https://www.researchgate.net/publication/283726442_Bloch_meets_Alzheimer> Acesso em 11 de abril de 2018. [accessed Apr 11 2018].

HUGHES, R.C. So what do your sugars do? **Glycoconj J.**, London, v. 17, (n. 7-9):, p. 567-75, 2000.

IBRAHIM, Z.A. et al. RAGE and TLRs: relatives, friends or neighbours? **Mol Immunol.**, Oxônia, v. 56(, n. 4):, p. 739-44, 2013.

JEBALI, A. et al. Lectin coated MgO nanoparticle: its toxicity, antileishmanial activity, and macrophage activation. **Drug Chem Toxicol.**, London, v. 37, n.(4):, p. 400-9, 2014.

JOHN, B.; HUNTER, C.A. Neutrophil soldiers or trojan horses? **Science.**, Washington, v. 321, n.(5891): , p. 917-18, 2008.

JONES, S. et al. Protein coated microcrystals formulated with model antigens and modified with calcium phosphate exhibit enhanced phagocytosis and immunogenicity. **Vaccine.**, São Paulo, v. 16, n.; 32(33), p.: 4234-42, 2014.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Microbiol.**, London, v. 9, n. (8):, p. 604-15, 2011.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? **J Glob Infect Dis.**, Philadelphia, v. 2, n.(2):, p. 177–85, 2010.

KENNEDY, J.F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, Amsterdã, v. 26, p. 219 -230, 1995.

KIMA, P.E. Leishmania molecules that mediate intracellular pathogenesis. **Microbes Infect.**, Paris, v. 16, n. (9, p.):721-6, 2014.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death Differ**, London, v.16, n.1, Jan, p. 3-11. 2009.

LASSMANN, T.; HAYASHIZAKI, Y.; DAUB, C.O. SAMStat: Monitoring biases in nextgeneration sequencing data. **Bioinformatics**, Oxford, v. . 27, n.(1):, p. 130–131, 2011.

LEI, H.Y.; CHANG, C.P. Induction of autophagy by concanavalin A and its application in anti-tumor therapy. **Autophagy**, Milton Park, v.. 3, n. (4):, p. 402-4, 2007.

LI, W.W. et al. Concanavalin A: a potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. **Biochem Biophys Res Commun**, Amsterdã, v. . 414, n.(2):, p. 282-6, 2011.

LIMA-JUNIOR, D.S. et al. Inflammasome-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. **Nat Med.**, London, v. 19(, n. 7):, p. 909-15, 2013.

LU, F.; HUANG, S. The Roles of Mast Cells in Parasitic Protozoan Infections. **Front Immunol**, Lausanne,. v. 6, n. ;8: , p. 363, 2017.

MIZWICKI, M.T. et al. Genomic and nongenomic signaling induced by 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ promotes the recovery of amyloid- β phagocytosis by Alzheimer's disease macrophages. **J Alzheimers Dis.**, Amsterdã, v. 29, n.(1):, p. 51-62, 2012.

MURRAY, H.W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, London, v.. 4, n. 366(9496), p. :11561-77, 2005.

NADERER, T.; VINCE, J.E. ; MCCONVILLE, M.J. Surface determinants of Leishmania parasites and their role in infectivity in the mammalian host. **Curr Mol Med.**, Sharjah, v. 4, n.(6):, p. 649-65, 2004.

NAGAE, M.; YAMAGUCHI, Y. Sugar recognition and protein-protein interaction of mammalian lectins conferring diverse functions. **Curr Opin Struct Biol.** Amsterdã, v. 34, p.:108-15, 2015.

NOVAIS, F.O. et al. Genomic profiling of human Leishmania braziliensis lesions identifies transcriptional modules associated with cutaneous immunopathology. **J Invest Dermatol.**, Philadelphia, v. 135, n.(1):, p. 94-101, 2015.

NOWICK, J.S. Exploring beta-sheet structure and interactions with chemical model systems. **Acc Chem Res.**, Washington, v. 41, n.(10):, p. 1319-30, 2008.

NUNES, E.S. et al. Cytotoxic effect and apoptosis induction by Bothrops leucurus venom lectin on tumor cell lines. **Toxicon.**, Amsterdã, v. 1; , n. 59(7-8):, p. 667-71, 2012.

NUNES, E.S. et al. Inactivation and fragmentation of lectin from *Bothrops leucurus* snake venom by gamma irradiation. **Radiation Physics and Chemistry**, Amsterdã, v. . 81, p.: 484–487, 2012.

- NUNES, E.S. et al. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**. Amsterdã, v. 159, n. (1):, p. 57-63, 2011.
- NYLÉN, S.; GAUTAM, S. Immunological Perspectives of Leishmaniasis. **Journal of global.**, Amsterdã, v. 2, n.(2): , p. 135–46, 2010.
- OLESZYCKA, E. et al. IL-1 α and inflammasome-independent IL-1 β promote neutrophil infiltration following alum vaccination. **FEBS J.**, New York, v. 283, n. (1):, p. 9-24, 2016.
- OLIVEIRA, W.N. et al. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **Cytokine.**, Amsterdã, v. 66:, p. 127–132, 2014.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (2015). Endemic Cutaneous Leishmaniasis, 2015. Geneva, 2017.
- PEUMANS, W.J. et al. Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. **Adv Exp Med Biol.**, London, v. 491:, p. 27-54, 2001.
- PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.**, Derwood, v. 109, n. (2), p. :347-52, 1995.
- PHAM, C.L.; KWAN, A.H.; SUNDE, M. Functional amyloid: widespread in Nature, diverse in purpose. **Essays Biochem.**, London, v. 56:, p. 207-19, 2014.
- QUINLAN, A.R.; HALL, I.M. BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26(, n. 6, p.):841–842, 2010.
- RABINOVICH, G.A. Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. **Cell Death Differ.**, London, v. 6, n.(8):, p. 711-21, 1999.
- RABINOVICH, G.A.; CROCI, D.O. Regulatory circuits mediated by lectin-glycan interactions in autoimmunity and cancer. **Immunity**. Cambridge, v. 36, n.(3):, p. 322-35, 2012.

RAPSINSKI, G.J. et al. Toll-like receptor 2 and NLRP3 cooperate to recognize a functional bacterial amyloid, curli. **Infect Immun.**, Washington, v. 83, n.(2):, p. 693-701, 2015.

REIS, L.C. et al. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Patologia Tropical.** Goiania, v. 35, n. (2): , p. 103-15, 2006.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis.**, London, v.(9):, p. 581-96, 2007.

RICCI-AZEVEDO, R. et al. Neutrophils Contribute to the Protection Conferred by ArtinM against Intracellular Pathogens: A Study on Leishmania major. **PLoS Negl Trop Dis.** São Francisco, v. 10, n.(4):e0004609, 2016. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004609>> Acesso em 8 de janeiro de 2018.

RINI, J.M. Lectin structure. **Annu Rev Biophys Biomol Struct.**, Stanford, v. 24, p.: 551-77, 1995.

ROBERTS, M.T.M. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. **Br. Med. Bull.**, Oxford, v. 75, p.: 76:1115, 2006.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions! **Int Immunol.**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 103-111doi: 10.1093/intimm/dxx075. [Epub ahead of print], 2017.

SANTOS, L.O. et al. Aspartic peptidases of human pathogenic trypanosomatids: perspectives and trends for chemotherapy. **Curr Med Chem.**, Sharjan, v. (25):, p. 3116-33, 2013.

SARAVANAN, V.; DAS, P. Structural, Molecular Motions, and Free-Energy Landscape of Leishmania Sterol-14 α -Demethylase Wild type and Drug Resistant Mutant: A Comparative Molecular Dynamics Study. **J Biomol Struct Dyn.**, London, v. 1, p.- 32, 2018.

- SCOTT, P. Leishmania: a parasitized parasite. **N Engl J Med.**, Massachusetts, v. 5;364, n.(18):, p. 1773-4, 2011.
- SHARON N. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. **J Biol Chem.**, São Francisco, v. 282, n. (5):, p. 2753-64, 2007.
- SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, Oxford, v. . 14, n.(11):, p. 53R-62R, 2004.
- SHARON, N.; LIS, H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. **Adv Exp Med Biol.**, London, v. 491, p.: 1-16, 2001.
- SHIO, M.T. et al. Host cell signalling and leishmania mechanisms of evasion. **J Trop Med.** London, 819512, 2012.
- SILVERMAN, J.M.; REINER, N.E. Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes. **Cell Microbiol.**, London, v. 13, n.1, p. 1-9, 2011.
- SINGH, J. et al. L-Asparaginase of *Leishmania donovani*: Metabolic target and its role in Amphotericin B resistance. **Int J Parasitol Drugs Drug Resist.**, Smithfield, v. 7, n.(3):, p. 337-349, 2017.
- SITOHY, M.; DOHEIM, M.; BADR, H. Isolation and characterization of a lectin with antifungal activity from Egyptian *Pisum sativum* seeds. **Food Chemistry**, Amsterdã, v. 104:, p. 971-79, 2007.
- TAKAHASHI, M. et al. Ultrastructural evidence for intracellular formation of amyloid fibrils in macrophages. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.** Berlin, v. 415, n. (5):, p. 411-9, 1989.
- Tegumentar Americana. 3. ed. rev. atual. Brasília: Ministério da Saúde; 2017.
- TEICHBERG, V.I. et al. A beta-D-galactoside binding protein from electric organ tissue of *Electrophorus electricus*. **Proc Natl Acad Sci USA.** Washington, v. 72, n.(4):, p. 1383-7, 1975.

TIELENS, A.G.M.; VAN HELLEMOND, J.J. Surprising variety in energy metabolism within Trypanosomatidae. **Trends in Parasitology**, Cambridge, . v. 25, n. (10),, p. 482-490, 2009.

UVERSKY, V.N.; FINK, A.L. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdã, . v. 6, n. ;1698(2), p. :1131-53, 2004.

VERBEECK, C. et al. Combination of A β Suppression and Innate Immune Activation in the Brain Significantly Attenuates Amyloid Plaque Deposition. **Am J Pathol**, Philadelphia, v.. 15. pii: S0002-9440(, n. 17), p. 30493-5, 2017.

VETRI, V. et al. Concanavalin A aggregation and toxicity on cell cultures. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdã, . v. 1804, n.(1):, p. 173-83, 2010.

VETRI, V. et al. Fluctuation methods to study protein aggregation in live cells: concanavalin A oligomers formation. **Biophys J**, Cambridge, v.. 2;100, n. (3):, p. 774-83, 2011.

YAMAZAKI, Y.; MORITA, T. Snake venom components affecting blood coagulation and the vascular system: structural similarities and marked diversity. **Curr Pharm Des.**, Sharjah, v. 13, n. (28):, p. 2872-86, 2007.

**APÊNDICE A - ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO INTERNATIONAL
JOURNAL OF MACROMOLECULES**



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>

In vitro effect of *Bothrops leucurus* lectin (BLL) against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* infection

Mary Ângela Aranda-Souza^{a,*}, Virginia Maria Barros de Lorena^b,
Maria Tereza dos Santos Correia^c, Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo^{a,*}

^a Laboratório de Biologia Celular de Patógenos, Instituto Aggeu Magalhães, Departamento de Microbiologia, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Brazil

^b Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Aggeu Magalhães, Departamento de Imunologia, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Brazil

^c Laboratório de Proteínas, Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Bioquímica, Recife, Brazil



ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 July 2018

Received in revised form 13 August 2018

Accepted 13 August 2018

Available online 15 August 2018

Keywords:

Lectin

Leishmania

Immunomodulation

ABSTRACT

Leishmania amazonensis and *Leishmania braziliensis* are the main causative agents of American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) in Brazil. As intracellular parasites, the infection by *Leishmania* species is dependent on the host immune response and the immunotherapy could be promissory for the development of new strategies to combat ATL. In this work we investigated the leishmanicidal potential of a galactose-binding lectin from the snake venom of *Bothrops leucurus* (BLL) during the infection with *L. amazonensis* and *L. braziliensis*. BLL inhibited the promastigote growth and viability of both species in a mechanism dependent on galactose and calcium. The treatment with BLL also decreases the survival of intracellular parasites for both species and induced profound ultrastructural changes on amastigotes without apparent damage to the host cells. The analysis of the cytokine profile revealed that BLL induced an increase in the proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α by infected macrophages in both species, but differed in relation to IL-1 β and IL-10 response. Future works using *in vitro* and *in vivo* models are necessary to support the use of these lectins as biotechnological tool in immunological studies.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmaniasis, a parasitic infection caused by protozoa species of the *Leishmania* genus, is a neglected tropical disease with 1.5 million new cases annually, 12–15 million people affected worldwide and 350 million people at risk of infection [1]. The clinical manifestation of the disease depends on both the parasite species and the immune status of the host ranging from self-healing cutaneous lesions to lethal visceral forms of the disease [2]. American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is characterised by lesions of the skin and oral or nasopharyngeal mucosa with different levels of complications and morbidity. In Brazil, where ATL is endemic, *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* are considered the main causative agents of the disease, leading to different clinical forms. Both *L. amazonensis* and *L. braziliensis* can cause localised cutaneous leishmaniasis (LCL), whereas in the most severe cases, *L. amazonensis* can lead to diffuse cutaneous (DCL) and *L. braziliensis* mucocutaneous lesions (ML) [2].

Regardless of the clinical form of leishmaniasis, the available chemotherapy relies on a few chemotherapeutic agents, which induce severe side effects, require a prolonged treatment time and present

widespread parasite resistance [3]. Furthermore, an effective prophylactic vaccine or immunotherapies for human leishmaniasis are still lacking [4].

In the search for new chemotherapeutic agents for leishmaniasis treatment, knowledge about their mode of action and the relationship among parasites, host cells and drugs are important issues to be considered. The cell surface of *Leishmania* spp. displays an abundance of sugar-rich glycoconjugates involved in the recognition by the host cell and in the virulence of the parasite [5]. On the other hand, host cells express a wide variety of pathogen-associated, molecular-pattern receptors, including numerous C-type lectin receptors, which play important roles in innate immune/adaptive responses by recognizing and binding to specific carbohydrates on the surface of pathogens [6–7]. Furthermore, as it is caused by an obligate intracellular parasite, residing mainly within macrophages, the course of *Leishmania* infection is strictly dependent on the host's immune response. This can lead to parasite clearance or contribute to pathogenesis, increasing the complexity of disease management. In this regard, immunotherapy could be promissory for the development of a new treatment or to improve the efficacy of the currently existing drugs [8].

Previous works carried out by our research group have demonstrated the anticancer and activities of a galactose-binding C-type lectin isolated and purified from the snake venom of *Bothrops leucurus* (BLL) [9–10]. BLL is a 30-kDa protein composed of two 15 kDa subunits that

* Corresponding authors.

E-mail addresses: profmaryaranda@gmail.com (M.Â. Aranda-Souza), bressan@cpqam.fiocruz.br (R.C.B.Q. de Figueiredo).

present effective antibacterial activity against the Gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Bacillus subtilis* [11]. C-type lectins (CTLs), such as BLL, are Ca⁺⁺-dependent glycan-binding proteins that share primary and secondary structural homology in their carbohydrate-recognition domains (CRDs), increasing their affinity for multivalent ligands [12].

Several studies have demonstrated the interaction of CTLs with both trypanosomatids and host cells leading to relevant cell responses. Concanavalin A, *P. odoratum*, *P. cyrtoneuma* and mulberry leaf lectins, for example, have been shown to promote cell death through mechanisms involving their interaction with membrane receptors [13–17]. In the trypanosomatid protozoan *Trypanosoma cruzi*, an analogue of Concanavalin A, the Cramoll 1,4 lectin, caused plasma membrane permeabilization, induced an increase in reactive oxygen species production and the impairment of parasite mitochondrion function, leading to cell death [18–19].

Despite the ability of lectins to recognise carbohydrates, eliciting different biological activities in both parasites and mammalian cells, the potential of lectins as chemotherapeutic agents against *Leishmania* remains scantily explored. In this work, we investigated the leishmanicidal and immunomodulatory potential of BLL during macrophage infection with *L. amazonensis* and *L. braziliensis*, the main etiological agents of ATL in Brazil.

2. Materials and methods

2.1. Lectin preparation

B. leucurus venom was kindly supplied by Dra. Miriam Camargo Guarnieri, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil. The lectin was purified according to the protocol previously described by Nunes et al. [11]. Briefly, lyophilised crude venom of *B. leucurus* (30 mg) was dissolved in 1 mL of CTBS buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl and 5 mM CaCl₂, pH 7.5) and centrifuged (2000g, 5 min, 25 °C) to remove insoluble material. The resulting supernatant was applied to a column of guar gel previously equilibrated with CTBS at a flow rate of 10 mL/h. BLL was eluted from the column with 200 mM galactose in CTBS. Protein concentration was determined according to Bradford [20] using bovine serum albumin as the standard.

2.2. Parasites

Promastigote forms of *L. amazonensis* (LTB0016) and *L. braziliensis* (LTB2903) were maintained in Schneider's medium supplemented with 10% bovine fetal serum and 100 IU/mL penicillin, at 26 °C and harvested during the exponential phase of growth. Amastigote forms were obtained from BALB/c peritoneal macrophages infected with the promastigote forms of the parasite.

2.3. In vitro effects of BLL on promastigote growth and viability

L. amazonensis and *L. braziliensis* promastigote forms (1 × 10⁶ cells/mL) were incubated at 26 °C in Schneider's medium in the presence or absence of BLL (0.01–3.3 μM). The culture density was determined daily using a Neubauer chamber. The BLL concentration that inhibited culture growth by 50% (IC₅₀) was estimated after 48 h of lectin incubation by regression analysis using the SPSS 8.0 software package. Additionally, we investigated the effect of galactose (Gal) and a calcium-chelating agent, ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA) on the leishmanicidal activity of BLL. For this, promastigote forms were subjected to the following treatments: 1) IC₅₀ BLL; 2) IC₅₀ BLL + 200 mM galactose or 3) IC₅₀ BLL + 1 mM EGTA. After 48 h of incubation, cell viability was determined using a CellTiter-Glo® Luminescent cell viability assay, based on quantification of ATP production by viable cells. The luminescent signal was measured

using a GloMax® Luminometer (Promega Corporation, USA). All experiments were performed in triplicate in three independent experiments.

2.4. Determination of mitochondrial membrane potential (ΔΨ_m)

The cationic probe JC-1 was used to determine the mitochondrial membrane potential (ΔΨ_m) according to Fonseca-Silva [21]. Promastigotes (1 × 10⁶ cells/mL) were cultured for 48 h in the absence or presence of 1) IC₅₀ BLL or 2) IC₅₀ BLL + 200 mM galactose. Cells were harvested and re-suspended in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS). Cell number was obtained by cell counting in a Neubauer chamber. Promastigotes (1 × 10⁷ cells/mL) were incubated with JC-1 (10 μg/mL) for 10 min at 37 °C. After washing twice with HBSS, fluorescence was measured spectrofluorometrically at 530 nm and 590 nm, using an excitation wavelength of 480 nm. The ratio of values obtained at 590 nm and 530 nm was plotted as relative ΔΨ_m. The mitochondrial uncoupling agent carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP; 20 μM) was used as a positive control.

2.5. Isolation of macrophages from Balb/c mice

After euthanasia, RPMI medium was injected to peritoneal cavity of mice and the macrophages were obtained from this medium. Cells were thoroughly washed and suspended in RPMI medium supplemented with 10% FBS and antibiotics. Further, macrophages were plated in well culture plates and incubated at 37 °C in 5% CO₂. After 3 h of incubation, the non-adherent cells were removed and fresh medium was added to each wells.

2.6. Cytotoxicity assay

Peritoneal macrophages from Balb/c mice were plated at 10⁶ cells/well in 96-well plates containing 100 μL of RPMI medium. The adhered macrophages were incubated for 48 h in RPMI in the absence or presence of different concentrations of BLL (0.3–3.3 μM). The cells were washed and incubated in fresh RPMI culture medium without phenol red, containing 5 mg/mL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), for an additional 3 h at 37 °C. After incubation, the cells were solubilised in DMSO (100 μL/well) and the formazan precipitate derived from MTT reduction was determined spectrophotometrically at 540 nm. The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) was determined by regression analysis using the software package SPSS 8.0. The selectivity index (SI) was determined as the ratio of CC₅₀ to the macrophage to IC₅₀ for the protozoa. Each assay was carried out in triplicate in three independent experiments.

2.7. In vitro effects of BLL on intracellular amastigotes

Macrophages from Balb/C mice were harvested and plated at 10⁶ cells/mL in a 24-well plate, containing RPMI medium supplemented with 10% FBS. Then, the macrophages were infected with promastigotes of *L. amazonensis* and *L. braziliensis* at a ratio of 1:20 and 1:10, respectively. Non-internalised parasites were removed by washing. The cells were incubated at 37 °C for 14 h and subjected to the following treatments: 1) BLL (0.8 and 1.6 μM), 2) BLL + 200 mM galactose, 3) BLL + 1 mM EGTA, 4) 10 μM Pentamidine for 24 h. After treatment the cells were stained with Giemsa (Sigma-Aldrich, USA) and the percentage of infected macrophages was determined by counting 100 randomly chosen cells in triplicate. The Survival Index was determined as the number of infected macrophages × number of amastigotes / total number of macrophages. The images were acquired using a Leica DMI4000 B microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

2.8. Nitric oxide production

In order to analyse the effect of lectin treatment on the NO production by macrophages, the cells were infected with *L. amazonensis* and *L. braziliensis* and treated with BLL. After treatment, 50 μL of supernatant of macrophage cultures were incubated with 50 μL of Griess reagent (Fluka, Sigma-Aldrich). Absorbance was measured at 540 nm with a Benchmark Plus (Bio-Rad Laboratories, Philadelphia, PA, USA) spectrophotometer. The concentration of nitrite was determined using a standard curve of sodium nitrite.

2.9. Cytokine determination in culture supernatants

In order to analyse the cytokines the supernatants of cultures were submitted to BD™ CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit. In addition, to evaluate the IL-1 β release was determined using the BD™ CBA Mouse IL-1 β Flex Set. The macrophages were treated or not as described above (*In vitro effects of BLL on intracellular amastigotes*), supernatants of cultures were stained with capture beads containing antibodies specific for IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β and IL-10 cytokines for 2 h. After the labelling procedure, the suspensions were washed twice with BD Wash Buffer and centrifuged at 200g for 5 min. Beads were then suspended with 300 μL of BD Wash Buffer. Data acquisition and analysis were performed using the BD CellQuest™ Pro and FCAP Array v.3 software packages (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, USA), respectively after collecting a minimum of 2100 events/sample.

2.10. Ultrastructural assay

Macrophages infected with promastigote forms of *L. amazonensis* and *L. braziliensis*, treated or not with BLL (IC_{50} and $\frac{1}{2} \text{IC}_{50}$ concentration) were washed with PBS and fixed for 1 h at 25 °C in a solution containing 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2. After washing in the same buffer, the cells were post-fixed for 1 h with 1% osmium tetroxide/0.8% potassium ferricyanide/5 mM CaCl_2 in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2. The cells were scraped and harvested by centrifugation at 3000 rpm for 5 min and dehydrated in a graded acetone series. After dehydration the samples were embedded for 72 h at 60 °C in Epoxy Embedding medium kit (Sigma Aldrich, USA). Ultrathin sections were stained with 5% uranyl acetate and lead citrate and observed in a Tecnai FEI spirit operating at 120 kV transmission electron microscope (TEM).

2.11. Ethical considerations

The present study was carried out in accordance with the ethical principles adopted by Brazilian law 11.794/2008 and approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (N° 77/2014).

2.12. Statistical analysis

Differences among groups were assessed by one-way ANOVA and the Student's *t*-test and Bonferroni Post-test. The significance level was set at $p < 0.05$. All tests were performed using the GraphPrisma software package (GraphPad Software, 5.03). Data are presented as means \pm standard deviation (SD).

3. Results

3.1. BLL inhibited promastigote growth

The incubation of promastigotes with BLL inhibited both *L. amazonensis* and *L. braziliensis* growth in a dose-dependent manner as compared to cells without treatment (control) (Fig. 1). Our results showed that the effect of BLL on culture density was slightly different for each species of parasite. Compared to the untreated cells, no difference in promastigote growth could be observed in *L. amazonensis* promastigotes treated with the lower concentration of BLL (0.03 μM) at any time during cultivation. On the other hand, at the same concentration we already observed a decrease in cell growth in *L. braziliensis*, after 48 h of cultivation. The difference existing between the growth patterns of the two species of *Leishmania* was more pronounced at 72 h of cultivation (Fig. 1). Although *L. braziliensis* appears to be more susceptible to BLL treatment than *L. amazonensis*, the values of IC_{50} for both species were very similar, corresponding to 1.5 ± 0.17 and $1.3 \pm 0.06 \mu\text{M}$ for *L. amazonensis* and *L. braziliensis*, respectively (Table 1).

3.2. The activity of BLL on promastigotes is dependent on galactose and Ca^{++}

To investigate whether the carbohydrate-binding activity of the lectin was related to its effect on promastigotes, the parasites were treated concomitantly with BLL and galactose, the specific BLL-binding sugar. To analyse the putative role of Ca^{++} on the leishmanicidal activity of BLL, we also treated the parasites with BLL and EGTA, a calcium-chelating agent. Our results showed that both EGTA and galactose are able to significantly revert the inhibitory effect of BLL on cell viability and recover cell growth to levels similar to the control cells for both *Leishmania* species (Fig. 2a).

3.3. BLL promotes a decrease in mitochondrial transmembrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$) on promastigote forms

Parasite mitochondrial function was evaluated using JC-1, a cationic mitochondrial vital dye. The spectrofluorometric data presented in Fig. 2b indicate a decrease of $31.5 \pm 2.7\%$ and $43.6 \pm 2.2\%$ ($p < 0.004$) on $\Delta\Psi\text{m}$ for *L. amazonensis* and *L. braziliensis* treated with BLL, respectively. These results indicate membrane potential depolarization in cells upon treatment with BLL. However, when the cells were incubated with BLL + Gal, no decrease could be observed in $\Delta\Psi\text{m}$. As expected,

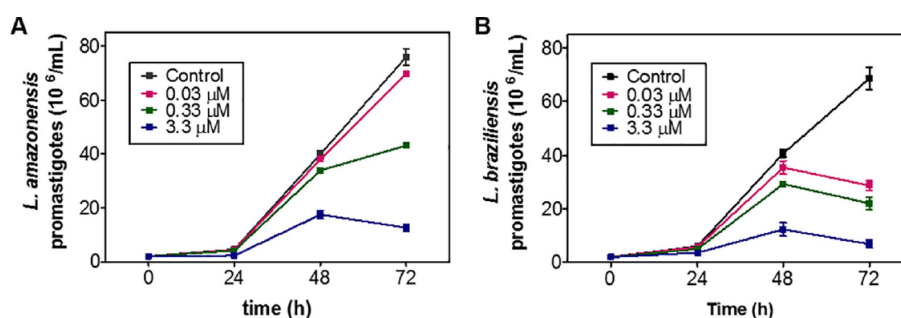


Fig. 1. Effect of BLL on the growth of *L. amazonensis* and *L. braziliensis* promastigotes. The values are presented as mean \pm S.D. from three independent experiments realised in triplicate.

Table 1
Evaluation of leishmanicidal and cytotoxic effects of *Bothrops leucurus* lectin.

	CC ₅₀ (μM)	Promastigote IC ₅₀ (μM)	Amastigote IC ₅₀ (μM)	SI PRO	SI AMA
Peritoneal macrophage	37.57 ± 3.84	–	–	–	–
<i>L. amazonensis</i>	–	1.5 ± 0.17	0.88 ± 0.24	25	42.6
<i>L. braziliensis</i>	–	1.3 ± 0.06	0.86 ± 0.07	28.9	43.6

decreased relative fluorescence intensity values were also observed following treatment with 20 μM FCCP (51% and 59.3% reduction for *L. amazonensis* and *L. braziliensis*, respectively).

3.4. BLL was more selective against the parasite than host cells

In order to analyse the cytotoxic potential of BLL on host cells, peritoneal macrophages were assayed by the MTT technique. Our results showed that the concentration of BLL was able to reduce host-cell viability by 50%, and was 37.57 ± 3.84 μM after 48 h of cultivation. The lectin proved to be 25 and 28.9 times more selective against the promastigote forms of *L. amazonensis* and *L. braziliensis*, respectively, than peritoneal macrophage, as demonstrated by the Selectivity Index (SI) (Table 1).

3.5. BLL affected amastigote survival inside macrophages

In view of our promising results on promastigote forms, we further evaluated the effects of lectin treatment on the intracellular amastigote forms of the parasites. The treatment of infected cells, for 24 h, with BLL drastically decreased the survival of intracellular amastigotes by approximately 28.51% and 36.95% at the concentration corresponding to 2 × IC₅₀ (1.6 μM BLL) for both species (*versus* 73.33 ± 3.07% and 75.5 ± 4.76% for infected-untreated macrophages). Lectin treatment also decreased the percentage of infected cells in a dose-dependent manner (Fig. 3A and B). The effect of BLL at higher concentrations was similar to those found for the reference drug Pentamidine, which causes an inhibition of 79.33% and 78.17% on the percentage of infected macrophage for *L. amazonensis* and *L. braziliensis*, respectively, when compared to the infected-untreated control (Fig. 3A). No statistically significant difference could be observed between the BLL (1.6 μM) and Pentamidine treatments. The percentage of infection in BLL-treated cells (1.6 μM), was 28.5 ± 7.91% and 35 ± 8.83% for *L. amazonensis* and *L. braziliensis*, respectively (Fig. 3B). Light microscopy analysis corroborated the inhibitory effect of BLL on both the number of infected cells and the survival

of intracellular amastigotes inside macrophages. Furthermore, in the cells treated with the higher concentration at the same incubation time, there was a decrease in the number and volume of parasitophorous vacuoles (Fig. 3C, arrow). For the BLL-treated amastigote form, the estimated IC₅₀ values were 0.88 ± 0.24 μM and 0.86 ± 0.07 μM for *L. amazonensis* and *L. braziliensis*, respectively. Therefore, BLL was shown to be 42.6 and 43.6 times more selective for *L. amazonensis* and *L. braziliensis*, respectively comparing to the host cell (Table 1).

3.6. *L. amazonensis*- and *L. braziliensis*-infected cells respond differently to BLL in the presence of galactose and EGTA

To verify if the effect of BLL against infected cells was dependent on the carbohydrate recognition by the lectin, the cells were simultaneously incubated with BLL and Gal or EGTA. Our results demonstrated that Gal or EGTA (Fig. 4) differently affected the activity of BLL on *L. amazonensis* and *L. braziliensis*. In both species, treatment with BLL alone, significantly reduced the viability of intracellular amastigotes and the percentage of infected macrophages. In *L. amazonensis*, the addition of Gal or EGTA to the BLL incubation medium did not significantly alter the inhibitory effect of BLL on the parasites. The association of BLL with Gal or EGTA significantly increased the survival of *L. braziliensis* amastigotes and the percentage of infected macrophages comparing to treatment with BLL alone. No statistically significant difference in the survival index was found between the control and BLL+ EGTA-treated cells.

3.7. BLL causes ultrastructural alterations in intracellular amastigotes

Control cells infected with *L. amazonensis* (Fig. 5A and B) and *L. braziliensis* (Fig. 5C–E) presented well-preserved intracellular amastigote forms free or in close association with the internal membrane of large parasitophorous vacuoles containing little or no cellular debris in its lumen (Fig. 5A–D). Intense exocytic activity across the plasma and flagellar membranes could be observed in both species (Fig. 5B and E). The treatment of infected cells with the lectin induced similar alterations in both species and severely damaged amastigotes could be observed even at a low concentration of BLL (½ IC₅₀) (Fig. 5F). Infected macrophages treated with BLL for 24 h exhibited an apparent reduction in the number of parasitophorous vacuoles as well as intracellular amastigotes (Fig. 5G and I). The morphological changes induced by BLL treatment included retraction and loss of cytoplasmic content compatible with a lytic event (Fig. 5G) and cell vacuolization. Actually, ruptured plasma membrane was commonly found in treated

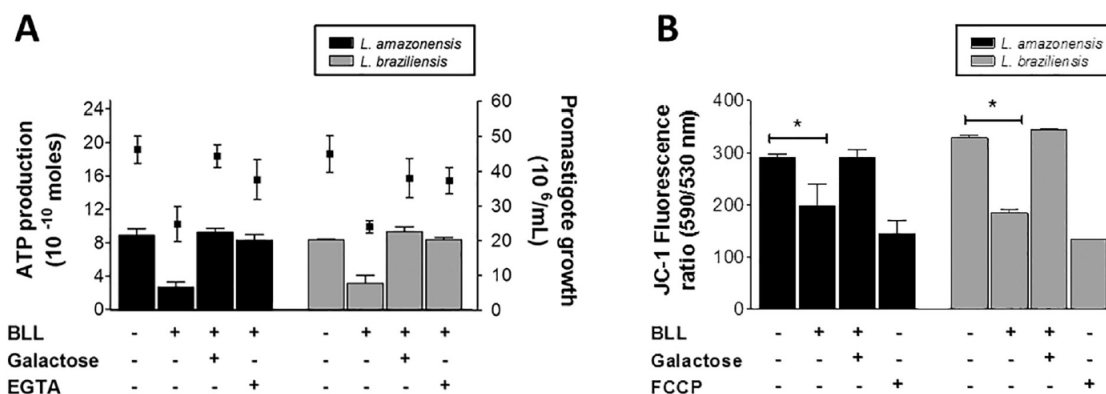


Fig. 2. Effect of Gal and EGTA on leishmanicidal activity and on mitochondrial membrane potential upon treatment with BLL (A) Promastigote growth is depicted as (■) and ATP production is expressed in columns. (B) Alterations in relative $\Delta\Psi_m$ values are expressed as the ratio of the fluorescence measurements at 590 nm (for J-aggregate) versus 530 nm (for J-monomer). The values are presented as mean ± S.D. from three independent experiments carried out in triplicate and * $p < 0.001$.

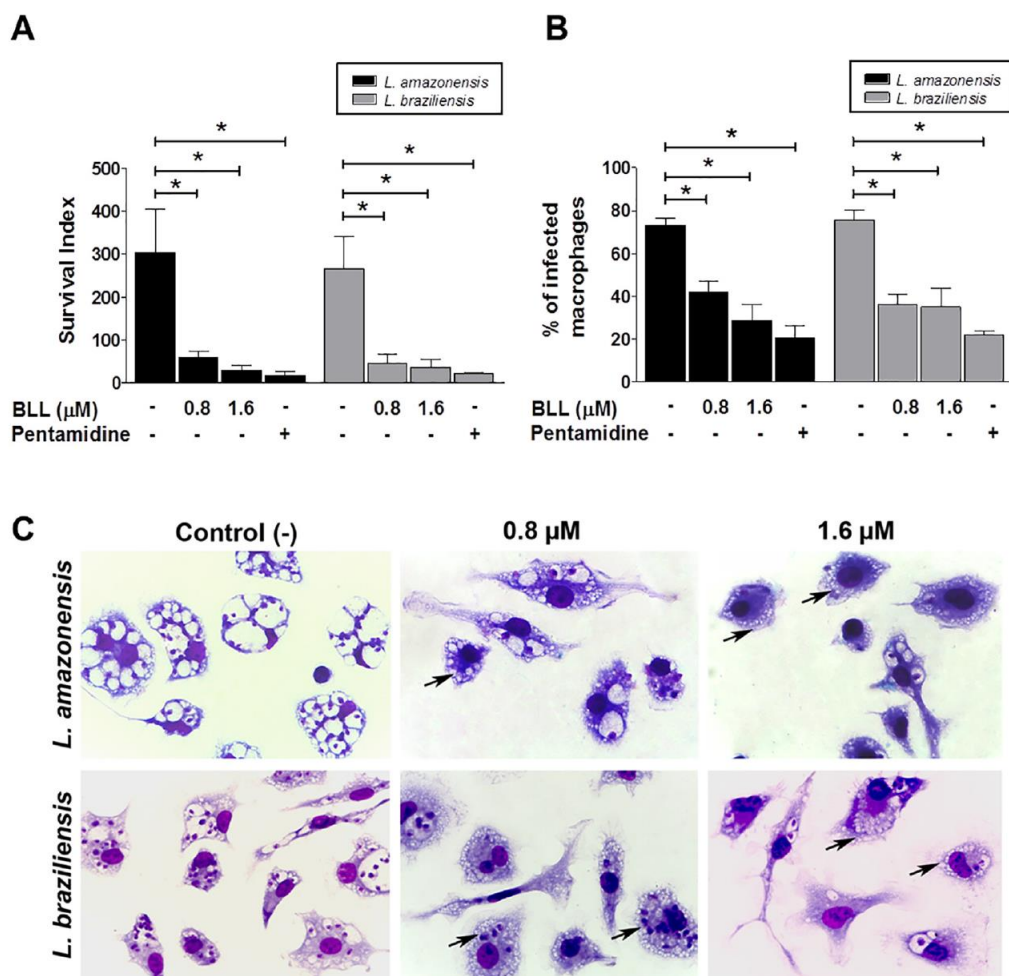


Fig. 3. Effect of BLL on intracellular amastigotes. (A) Survival index of amastigotes within macrophages infected with *L. amazonensis* and *L. braziliensis* and treated with BLL or Pentamidine for 24 h (B) Effects of BLL and Pentamidine on the percentage of macrophage infection by *L. amazonensis* and *L. braziliensis*. (C) Light microscopy of leishmania-infected peritoneal macrophages treated or not with BLL or Pentamidine. The data represent the mean of three independent experiments performed in duplicate \pm SD. * Significant values ($p < 0.05$).

cells of both species (Fig. 5F). The lumen of parasitophorous vacuoles was usually enriched with cell debris, flocculated material and myelin figures (Fig. 5H). Some of them were also found empty or containing

partially degraded amastigote cells (Fig. 5G–I). Interestingly, no exocytic activity was observed in intracellular amastigote forms treated with BLL (Fig. 5F–J).

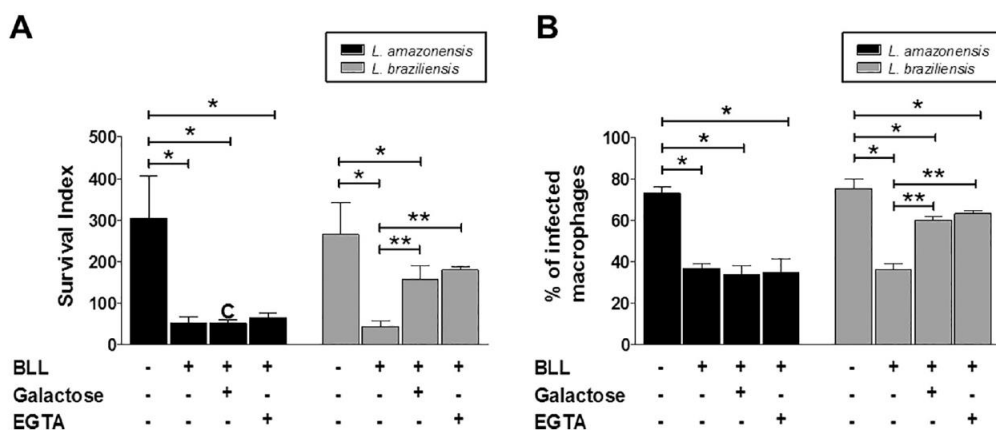
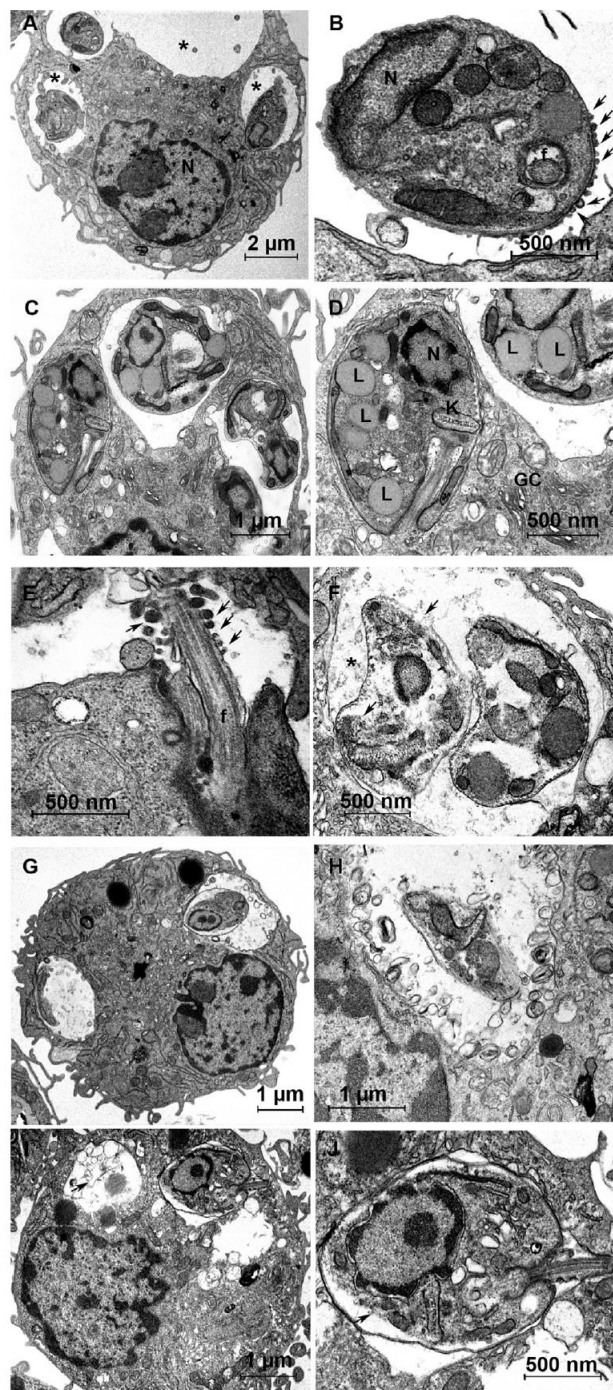


Fig. 4. Effect of calcium and Gal on the activity of BLL against *L. amazonensis* and *L. braziliensis* amastigotes. (A) Survival index of intracellular amastigotes treated or not with BLL, BLL + Gal or BLL + EGTA. (B) the effect of the association of BLL with Gal or EGTA on the percentage of infected macrophages. The data represent the mean of two independent experiments performed in triplicate \pm SD. * Significant values ($p < 0.05$).

3.8. BLL differentially modulated the secretion of cytokines and NO production during the course of macrophage infection with *L. braziliensis* and *L. amazonensis*

To investigate the ability of BLL to modulate the host's immune response, cytokine-profile and NO-production assays were performed in peritoneal macrophages subjected to *L. braziliensis* and *L. amazonensis*



infection. A significant increase in the release of IL-10, INF- γ , TNF- α , IL-6 and IL-1 β , as well as in NO production was observed in non-infected macrophages treated with BLL at 0.8 μ M as compared with non-treated cells (Fig. 6). Comparing to non-infected and untreated cells, infection with both species of *Leishmania* induced a significant increase of TNF- α , IL-6 and IL-1 β . The level of IL-10 increased only in *L. amazonensis*-infected macrophages (Fig. 6A), whereas INF- γ release in infected-macrophages was not shown to be statistically significant when compared to the uninfected control (Fig. 6B). The level of IL-10 increased only in *L. amazonensis*-infected macrophages (Fig. 6A), whereas INF- γ release in infected-macrophages was not shown to be statistically significant when compared to the uninfected control (Fig. 6B). Treatment of peritoneal macrophages with BLL also induced a significant increase in the release of the proinflammatory cytokines TNF- α and IL-6 in comparison to the infected-untreated control (Fig. 6C and D). However, the response of infected-cells to BLL treatment varied between the parasite species. The IL-6 release, for example, was tenfold higher in BLL-treated *L. amazonensis*-infected cells than in those infected by *L. braziliensis*. As compared to uninfected cells, the infection with both species *per se*, induced a significant increase in the secretion of IL-1 β . On the other hand, the treatment with BLL, caused a significant decrease in this cytokine release in *L. amazonensis*-infected cells, whereas in macrophages infected with *L. braziliensis* there was a significant increase in the level of this cytokine, compared to untreated-infected cells (Fig. 6E). Nitrite production was found to be similar in both *L. braziliensis*- and *L. amazonensis*-infected cells subjected to BLL treatment. Treatment with the lectin induced a 4-fold increase in nitrite compared to the infected-untreated control (Fig. 6F).

4. Discussion

The interaction of lectins with specific carbohydrates plays a role in a number of biological processes, such as host–pathogen recognition, cell differentiation and immune response. Thus, understanding of the nature of these interactions is not only useful for the elucidation of their biological function but can also be applied to different research areas such as immunology, drug development and delivery and diagnostics [22].

In this work we investigated the biological activity of the lectin BLL on the interaction of *L. braziliensis* and *L. amazonensis* with macrophages. For this, we first evaluated if the lectin has any leishmanicidal activity on promastigote forms of both parasite species. Our results showed that BLL inhibited the growth and viability of promastigote forms of *L. amazonensis* and *L. braziliensis* in a time- and dose-dependent manner. It has been demonstrated that the binding of lectins to specific oligosaccharides on the cell membrane is able to inhibit the growth of pathogens and trigger cell death by mechanisms that are not completely understood [18,23]. On the other hand, cells that do

Fig. 5. Effects of BLL on intracellular amastigote ultrastructure as observed by transmission electron microscopy. (A and B) macrophage infected with *L. amazonensis* and untreated; (A) Low magnification of control peritoneal macrophage infected with *L. amazonensis*, showing the presence of well-preserved amastigotes inside PV vacuoles (*). (B) *L. amazonensis* amastigote presenting high exocytic activity at the plasma membrane (arrow). (C) Low magnification of *L. braziliensis*-infected cells showing the presence of amastigotes in either tight-fitting or loose PV (arrow). (D) Detail at high magnification of an *L. braziliensis* amastigote in a tight-fitting PV, presenting a well-preserved nucleus (N) and a number of lipid drops (L) dispersed throughout the cytoplasm. (E) Detail of flagellar pocket region of control *L. braziliensis* amastigote showing a number of vesicles budding from flagellar membrane. (F) Detail of macrophage infected with *L. amazonensis* amastigotes and treated with IC₅₀ BLL, presenting destroyed organelles and ruptured the membrane (arrow). Note the presence of flocculated material in the lumen of PV (*). (G) Low magnification of *L. amazonensis*-infected cells treated with IC₅₀ BLL, showing one PV containing only cell debris and another containing a damaged amastigote which shows a retracted cytoplasm (arrow). (H) Highly magnified detail of a PV from *L. braziliensis*-infected cells, treated with BLL, containing a partially degraded amastigote, vesicles and myelinic figures inside; (I) Low magnification of a macrophage infected with *L. braziliensis*, showing PV containing either degraded material or a damaged intracellular amastigote. Note in (J) the detail of the same amastigote presenting an electron-lucent space between the plasma membrane and cytoplasm.

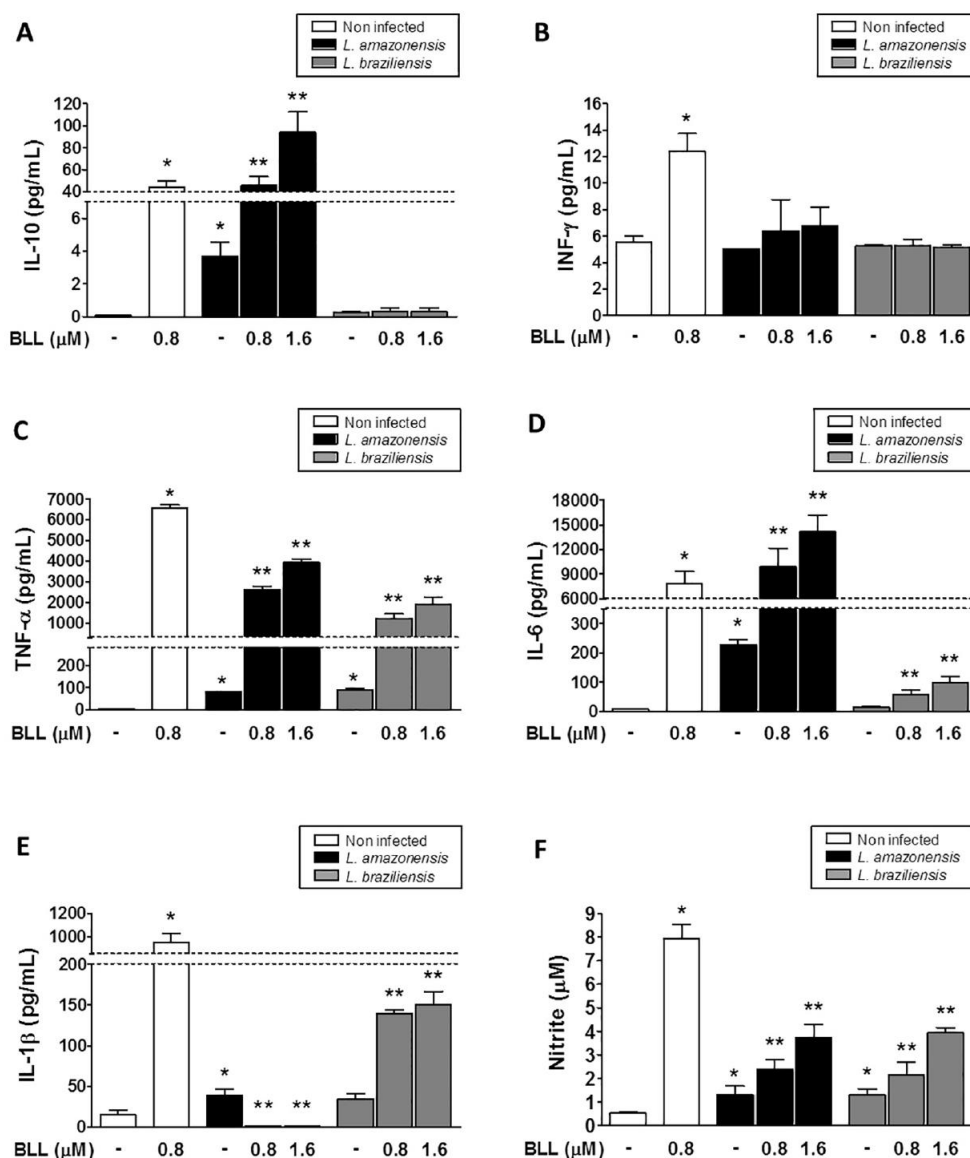


Fig. 6. Effects on production of proinflammatory and regulatory cytokines. (A–E) cytokine production in control and BLL-treated cells. (F) Nitrite production under the same conditions. (*) Significant differences in relation to non-infected control and (**) significant differences in relation to infected control for each species tested, $p < 0.001$.

not possess these carbohydrates are protected against the cytotoxic effects of these proteins [19]. Naderer and colleagues [24] demonstrated that the complex glycoalkyl surface of *Leishmania* promastigotes are rich in glycoconjugates containing galactose (the BLL-binding carbohydrate) and mannose residues. In this regard, the leishmanicidal effect of BLL on these forms could be due to the recognition of galactose on the parasite's plasma membrane. Consistently, we demonstrated that the simultaneous incubation of promastigotes with BLL and galactose was able to restore cell growth and viability to levels found in the control cells. Besides the specificity of lectin towards galactose, we have demonstrated that the activity of BLL is also dependent on the presence of Ca^{++} , as the addition of a calcium-chelating agent to BLL medium strongly inhibited the leishmanicidal effect of this lectin. Nunes et al. [11] have also shown that the hemagglutination activity of BLL was abolished in the presence of chelating agents, indicating that Ca^{++} is essential for the carbohydrate recognition by BLL. Although the plasma membrane is the primary target of lectin

interactions, the possibility that these proteins act on other intracellular components cannot be ruled out. Fernandes et al. [19] have demonstrated that, after binding to glycoproteins on the cell membrane of the protozoa *Trypanosoma cruzi*, a lectin isolated from seeds of *Cratylia mollis* was subsequently internalised. The lectin colocalised with parasite mitochondrion, where it impaired the functioning of the organelle and lead to cell death by necrosis. Corroborating this idea, we showed that the mitochondrial membrane potential was inhibited by BLL treatment on promastigote forms. Again, the addition of Gal to BLL was able to inhibit the deleterious effects of the lectin on parasite mitochondrion.

The cytotoxicity assays showed that BLL, at the same concentrations used in treated-infected cells was not significantly toxic to macrophages, the main target of parasite infection. Corroborating our data, various studies have demonstrated that lectins could exert a leishmanicidal effect without presenting cytotoxic effects towards host cells [25–27].

The low cytotoxicity to macrophages and the high selectivity of BLL towards promastigotes prompted us to investigate the effects of BLL on the relevant intracellular amastigotes, which are responsible for the clinical manifestations of leishmaniasis. Our results showed that BLL alone caused significant reductions in intracellular amastigote survival as well as the percentage of macrophages infected with *L. amazonensis* or *L. braziliensis*, in a similar way. However, depending on the species of leishmania involved, the infected macrophages responded differently to simultaneous treatment with BLL and EGTA or galactose. Whereas Ca^{++} and galactose is not required for the inhibitory activity of BLL on intracellular *L. amazonensis* amastigotes, significant differences in the survival index and percentage of infected cell were observed in *L. braziliensis*-infected macrophages, as compared to BLL alone. However, neither galactose nor EGTA were able to restore the survival index and the percentage of infected cell to levels found in the control cells. These data suggest that, at least for *L. amazonensis*, the inhibitory effect of BLL on amastigotes could not depend on the binding of galactose residues on the host and/or amastigote surfaces.

The TEM analysis corroborated the deleterious effect of BLL on intracellular amastigotes of both species of *Leishmania*, without causing any observable damage to macrophages. An interesting finding was the absence of amastigote-derived extracellular vesicles in infected cells treated with BLL. Extracellular vesicles (EV) in *Leishmania* are important players in the horizontal transfer of information between cells, acting as messengers capable of priming host cells, facilitating the infection and the manipulation of the host-cell immune response [28]. Several studies have described the secretion of exosomes and other related EVs in *L. donovani* and *L. mexicana* as a mechanism of the immunomodulation and development of inter-cellular infection [29–31]. Furthermore, it has been shown that EVs favour a proinflammatory response. In fact, Silverman and Reiner [31] demonstrated that the increase in secretion of EVs or exosomes in the early stages of *L. donovani* infection was directly related to the cytokine production by immunocompetent cells. In this regard, the blocking of parasite EVs by BLL could ameliorate the deleterious effects associated with excessive stimulation of the immune response; reducing parasite burden and disease severity [32]. Although the inhibition of EV production in intracellular amastigote could be due to a direct action of BLL on these forms, we cannot rule out the possibility that this effect might also be associated with modifications of host cell immune response during BLL treatment.

It is well known that macrophages are able to recognise pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by pattern-recognition receptors (PRRs), such as Toll-like and NOD-like receptors, leading the cell to release inflammatory mediators such as reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (e.g. NO), as well as proinflammatory cytokines [33–34]. These mediators are responsible for parasite clearance and the development of an adaptive response. Paradoxically, the innate and adaptive response against the parasite could lead to the pathogenesis of leishmaniasis, causing tissue destruction and inducing disease relapse [8]. The dichotomy existing between resistance and susceptibility has led to investigations of new therapeutic alternatives which act on the pathogenic microorganism and also have immunomodulatory activity, driving the immune response to control infection without causing tissue damage [35]. Despite the immunomodulatory potential of lectins, few studies have focused on their capacity to stimulate immune effector cells to combat leishmania infection. In this regard, we investigated the effect of BLL on NO and cytokine production by *Leishmania*-infected cells. Our results showed that the presence of BLL *per se* lead to a significant increase in all cytokines analysed as well as an enhancement in the production of NO by non-infected macrophages, suggesting an immunomodulatory role of BLL in these cells. This response to BLL treatment is strictly modulated by the presence of parasite infection with both species of *Leishmania*. In addition, the data showed that BLL treatment induced significant changes in the cytokine profile and NO production in macrophages infected with both species of *Leishmania*. Although some differences between macrophages

infected with *L. amazonensis* and *L. braziliensis* were observed, treatment with BLL induced a proinflammatory profile in macrophages with significantly increased production of NO, IL-6 and TNF- α , but not of INF- γ . TNF- α has been associated with host resistance against several microorganisms by inducing NO production, the main microbicidal molecules produced by macrophages to combat intracellular pathogens [36]. Furthermore, it has been reported that the release of TNF- α , induced by activation of Toll-like receptor 2 (TRL2), led to signalling for NF κ B expression, acting as a defence mechanism against *L. braziliensis* infection [37–38]. Accordingly, some lectins, such as ArtinM from the seeds of *Artocarpus heterophyllus*, have been shown to bind to TLR2-N-glycans, acting as a TLR2 agonist that exerts an immunomodulatory function [39–40].

The most noteworthy difference between *L. amazonensis*- and *L. braziliensis*-infected macrophages in the presence of BLL concerns the IL-1 β and IL-10 response. In *L. amazonensis*-infected cells, a significant decrease of IL-1 β with an increased production of IL-10 in the presence of BLL was observed. On the other hand, an increase in IL-1 β with unaltered production of IL-10, compared to infected-untreated cells, was seen in *L. braziliensis*-infected macrophages. The bioactive form of IL-1 β is released as a product of the enzymatic cleavage of pro-IL-1 β by NALP3 inflammasome, which is a multimolecular platform that has been shown to play a pivotal role in hampering *L. donovani*, *L. amazonensis* and *L. braziliensis* infection via induction of oxidative stress [41]. The higher production of this cytokine in *L. braziliensis*-infected cells could have contributed to a decrease in the survival index and percentage of *L. braziliensis*-infected cells observed in our study. Accordingly, Ricci-Azevedo et al. [40] demonstrated that the treatment of neutrophils with ArtinM lectin enhances the clearance of the intracellular pathogen *L. major* through a mechanism that includes production of IL-1 β and other proinflammatory cytokines.

Contrarily to what was observed in *L. braziliensis*, the treatment of *L. amazonensis*-infected cells with BLL was shown to suppress the IL-1 β responses without affecting NO production. The increased levels of the regulatory cytokine IL-10 could be responsible for the decrease of IL-1 β production, mitigating an exacerbate proinflammatory activation and preventing further damage to the host cells. In this case the production of NO could be sustained by the TNF- α and IL-6 stimulation. As BLL treatment led to the production of proinflammatory cytokines in macrophages infected by both species and IL-1 β for *L. braziliensis*, our results strongly suggest that Toll-like and/or NOD-like receptors are involved in the recognition of BLL. Consistently, in a previous study we have demonstrated that BLL under physiological conditions is able to form amyloid aggregates, which are efficiently phagocytised by macrophages, inducing a proinflammatory response (unpublished data). Usually the recognition of amyloid structures by immune cells is associated with Toll 2 receptors and the activation of inflammasome with release of IL-1 β [42]. The intracellular fate of BLL as well as the identification of target organelles and/or molecules in *Leishmania* is currently under investigation.

5. Conclusions

Taken together our results showed that the C-type lectin BLL has leishmanicidal and immunomodulatory effects on macrophages infected with *L. braziliensis* and *L. amazonensis*. The knowledge about the specie-specific differences may be the key point for identifying virulence factors and to understand the differential mechanisms used by each leishmania specie to infect macrophages, contributing for the discovery of new drug targets in *Leishmania* spp.

Acknowledgments

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação

de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (APQ/FACEPE 0584-2.13/15). Aranda-Souza is a PhD student supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) in cooperation with FIOCRUZ on a Brasil sem Miséria fellowship. The authors acknowledge Dr. Antonio Pereira das Neves (IAM/FIOCRUZ) for his decisive suggestions on the course of this work.

References

- [1] J. Alvar, I.D. Vélez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, M. den Boer, WHO Leishmaniasis Control Team, Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence, *PLoS One* 7 (5) (2012), e35671.
- [2] C.S. Gosch, C.P. Marques, B.S. Resende, J.D.S. Souza, R.A.D.S. Rocha, D.S.S. Lopes, M.S. Gosch, F.R. Dias, M.L. Dorta, American tegumentary leishmaniasis: epidemiological and molecular characterization of prevalent *Leishmania* species in the State of Tocantins, Brazil, 2011–2015, *Rev. Inst. Med. Trop.* 59 (2017), e91. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201759091>.
- [3] M.A. Cunha, A.C. Leão, R. de Cassia Soler, J.A. Lindoso, Efficacy and safety of liposomal amphotericin B for the Treatment of Mucosal leishmaniasis from the new world: a retrospective study, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 93 (6) (2015) 1214–1218.
- [4] N. Tiwari, M.R. Gedda, V.K. Tiwari, S.P. Singh, R.K. Singh, Limitations of current therapeutic options, possible drug targets and scope of natural products in control of leishmaniasis, *Mini-Rev. Med. Chem.* 18 (1) (2018) 26–41, <https://doi.org/10.2174/1389557517666170425105129>.
- [5] L. Jecna, A. Dostalova, R. Wilson, V. Seblova, K.P. Chang, P.A. Bates, P. Volf, The role of surface glycoconjugates in *Leishmania* midgut attachment examined by competitive binding assays and experimental development in sand flies, *Parasitology* 140 (8) (2013) 1026–1032.
- [6] A. Vázquez-Mendoza, J.C. Carrero, M. Rodríguez-Sosa, Parasitic infections: a role for C-type lectins receptors, *Biomed. Res. Int.* 2013 (2013), 456352.
- [7] C.G. Figdor, Y. van Kooyk, G.J. Adema, C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells, *Nat. Rev. Immunol.* 2 (2) (2002) 77–84.
- [8] M. Rossi, N. Fasel, How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! *Int. Immunol.* (2017) <https://doi.org/10.1093/intimm/dx075> (Epub ahead of print).
- [9] M.A. Aranda-Souza, F.A. Rossato, R.A. Costa, T.R. Figueira, R.F. Castilho, M.C. Guamiere, et al., A lectin from *Bothrops leucurus* snake venom raises cytosolic calcium levels and promotes B16-F10 melanoma necrotic cell death via mitochondrial permeability transition, *Toxicol. Res.* 2 (2014) 97–103.
- [10] E.S. Nunes, M.A. Souza, A.F. Vaz, T.G. Silva, J.S. Aguiar, A.M. Batista, M.M. Guerra, M.C. Guarnieri, L.C. Coelho, M.T. Correia, Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines, *Toxicol. Res.* 59 (7–8) (2012) 667–671.
- [11] E.S. Nunes, M.A. Aranda-Souza, A.F. Vaz, G.M. Santana, F.S. Gomes, L.C. Coelho, P.M. Paiva, R.M. Da Silva, R.A. Silva-Lucca, M.L. Oliva, M.C. Guarnieri, M.T.S. Correia, Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 159 (1) (2011) 57–63.
- [12] R.D. Cummings, R.P. McEver, C-Type Lectins. *Essentials of Glycobiology* [Internet], 3rd edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), 2017 (-Chapter 34. New York).
- [13] T. Liu, L. Wu, D. Wang, H. Wang, J. Chen, C. Yang, J. Bao, C. Wu, Role of reactive oxygen species-mediated MAPK and NF- κ B activation in polygonatum cyrtoneema lectin-induced apoptosis and autophagy in human lung adenocarcinoma A549 cells, *J. Biochem.* 160 (6) (2016) 315–324.
- [14] B. Liu, C.Y. Li, H.J. Bian, M.W. Min, L.F. Chen, J.K. Bao, Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells, *Arch. Biochem. Biophys.* 482 (2009) 1–6, <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.12.003>.
- [15] B. Liu, Y. Cheng, H.J. Bian, J.K. Bao, Molecular mechanisms of *Polygonatum cyrtoneema* lectin-induced apoptosis and autophagy in cancer cells, *Autophagy* 5 (2009) 253–255.
- [16] B. Liu, Y. Cheng, B. Zhang, H.J. Bian, J.K. Bao, *Polygonatum cyrtoneema* lectin induces apoptosis and autophagy in human melanoma A375 cells through a mitochondria-mediated ROS-p38-p53 pathway, *Cancer Lett.* 275 (2009) 54–60.
- [17] Q. Zhao, X. Cao, B. Zeng, C. Wang, L. Yan, C. Xu, *Musca domestica* larva lectin induces apoptosis in BEL-7402 cells through a mitochondria-mediated reactive oxygen species way, *Biol. Pharm. Bull.* 33 (2010) 1274–1278.
- [18] M.P. Fernandes, N.M. Inada, M.R. Chiaratti, F.F.B. Araújo, F.V. Meirelles, M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, M.J.M. Alves, F.R. Gadelha, A.E. Vercesi, Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin, *J. Bioenerg. Biomembr.* 42 (2010) 69–78.
- [19] M.P. Fernandes, A.C.R. Leite, F.F.B. Araújo, S.T.O. Saad, M.O. Baratti, M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, F.R. Gadelha, A.E. Vercesi, The *Cratylia mollis* seed lectin induces membrane permeability transition in isolated rat liver mitochondria and a cyclosporine A-insensitive permeability transition in *Trypanosoma cruzi* mitochondria, *J. Eukaryot. Microbiol.* (2014) 12118–14473.
- [20] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [21] F. Fonseca-Silva, J.D. Inacio, M.M. Canto-Cavalheiro, E.E. Almeida-Amaral, Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*, *PLoS One* 6 (2) (2011), e14666. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014666>.
- [22] M.P. Christie, I. Toth, P. Simerská, Biophysical characterization of lectin-glycan interactions for therapeutics, vaccines and targeted drug-delivery, *Future Med. Chem.* 6 (18) (2014) 2113–2129, <https://doi.org/10.4155/fmc.14.130>.
- [23] N.M. Hammad, N.E. El Badawy, H.A. Ghramh, L.M. Al Kady, Mannose-binding lectin: a potential therapeutic candidate against candida infection, *Biomed. Res. Int.* 2018 (2018) 2813737, <https://doi.org/10.1155/2018/2813737>.
- [24] T. Naderer, J.E. Vince, M.J. McConville, Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host, *Curr. Mol. Med.* 4 (6) (2004) 649–665.
- [25] A. Jebali, S. Hekmatimoghaddam, B. Kazemi, A. Allaveisie, A. Masoudi, K. Daliri, N. Sedighi, J. Ranjbari, Lectin coated MgO nanoparticle: its toxicity, antileishmanial activity, and macrophage activation, *Drug Chem. Toxicol.* 37 (4) (2014) 400–409.
- [26] P.J. Alcolea, A. Alonso, F. Garcia-Tabares, A. Torano, V. Larraga, An Insight into the proteome of *Crithidia fasciculata* choanomastigotes as a comparative approach to axenic growth, peanut lectin agglutination and differentiation of *Leishmania* spp. promastigotes, *PLoS One* 9 (12) (2014), e113837.
- [27] L.E. Castanheira, D.C. Nunes, T.M. Cardoso, S. Santos Pde, L.R. Goulart, R.S. Rodrigues, M. Richardson, M.H. Borges, K.A. Yoneyama, V.M. Rodrigues, Biochemical and functional characterization of a C-type lectin (BpLec) from *Bothrops pauloensis* snake venom, *Int. J. Biol. Macromol.* 54 (2013) 57–64.
- [28] R. Belo, N. Santarém, C. Pereira, B. Pérez-Cabezas, F. Macedo, M. Leite-de-Moraes, A. Cordeiro-da-Silva, *Leishmania infantum* exoproducts inhibit human invariant NKT cell expansion and activation, *Front. Immunol.* 8 (2017) 710, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00710>.
- [29] A.R. Escalona-Montañón, D.M. Ortiz-Lozano, A. Rojas-Bernabé, A.A. Wilkins-Rodríguez, H. Torres-Guerrero, R. Mondragón-Flores, R. Mondragón-Gonzalez, I. Becker, L. Gutiérrez-Kobeh, M.M. Aguirre-García, *Leishmania mexicana*: promastigotes and amastigotes secrete protein phosphatases and this correlates with the production of inflammatory cytokines in macrophages, *Parasitology* 143 (11) (2016) 1409–1420.
- [30] J.M. Silverman, J. Clos, C.C. de'Oliveira, O. Shirvani, Y. Fang, C. Wang, L.J. Foster, N.E. Reiner, An exosome-based secretion pathway is responsible for protein export from *Leishmania* and communication with macrophages, *J. Cell Sci.* 123 (Pt 6) (2010) 842–852.
- [31] J.M. Silverman, N.E. Reiner, Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes, *Cell. Microbiol.* 13 (1) (2011) 1–9.
- [32] A.J. Szempruch, L. Dennison, R. Kieft, J.M. Harrington, S.L. Hajduk, Sending a message: extracellular vesicles of pathogenic protozoan parasites, *Nat. Rev. Microbiol.* 14 (11) (2016) 669–675, <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.110>.
- [33] Z.A. Ibrahim, C.L. Armour, S. Phipps, M.B. Sukkar, RAGE and TLRs: relatives, friends or neighbours? *Mol. Immunol.* 56 (4) (2013) 739–744.
- [34] F. Lu, S. Huang, The roles of mast cells in parasitic protozoan infections, *Front. Immunol.* 6 (8) (2017) 363.
- [35] M.M.M. Alves, L.M. Brito, A.C. Souza, B.C.S.H. Queiroz, T.P. de Carvalho, J.F. Batista, J.S.S.M. Oliveira, I.L. de Mendonça, S.R.S. Lira, M.H. Chaves, J.C.R. Gonçalves, S.M.P. Carneiro, D.D.R. Arcanjo, F.A.A. Carvalho, Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by *Leishmania major*, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 390 (9) (2017) 893–903, <https://doi.org/10.1007/s00210-017-1387-y>.
- [36] S.G. Fonseca, P.R. Romão, F. Figueiredo, R.H. Morais, H.C. Lima, S.H. Ferreira, F.Q. Cunha, TNF-alpha mediates the induction of nitric oxide synthase in macrophages but not in neutrophils in experimental cutaneous leishmaniasis, *Eur. J. Immunol.* 33 (8) (2003) 2297–2306.
- [37] I.C. Ibrahim, R.R. de Assis, N.L. Pessoa, M.A. Campos, M.N. Melo, S.J. Turco, R.P. Soares, Two biochemically distinct lipophosphoglycans from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* trigger different innate immune responses in murine macrophages, *Parasit. Vectors* 7 (6) (2013) 54.
- [38] R.R. Assis, I.C. Ibrahim, F.S. Noronha, S.J. Turco, R.P. Soares, Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: modulation of innate immune system and variations in carbohydrate structure, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6 (2) (2012), e1543.
- [39] R. Ricci-Azevedo, M.C. Roque-Barreira, N.J. Gay, Targeting and recognition of toll-like receptors by plant and pathogen lectins, *Front. Immunol.* 8 (2017) 1820, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01820>.
- [40] R. Ricci-Azevedo, A.F. Oliveira, M.C. Conrado, F.C. Carvalho, M.C. Roque-Barreira, Neutrophils contribute to the protection conferred by ArtinM against intracellular pathogens: a study on *Leishmania major*, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10 (4) (2016), e0004609. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004609>.
- [41] D.S. Lima-Junior, D.L. Costa, V. Carregaro, L.D. Cunha, A.L. Silva, T.W. Mineo, F.R. Gutierrez, M. Bellio, K.R. Bortoluci, R.A. Flavell, M.T. Bozza, J.S. Silva, D.S. Zamboni, Inflammation-derived IL-1 β production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*, *Nat. Med.* 19 (7) (2013) 909–915.
- [42] A. Halle, V. Hornung, G.C. Petzold, C.R. Stewart, B.G. Monks, T. Reinheckel, K.A. Fitzgerald, E. Latz, K.J. Moore, D.T. Golenbock, The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta, *Nat. Immunol.* 9 (8) (2008) 857–865, <https://doi.org/10.1038/ni.1636>.

APÊNDICE B - ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO TOXICON**A C-type Lectin from *Bothrops leucurus* snake venom forms amyloid-like aggregates in RPMI medium and are efficiently phagocytosed by peritoneal macrophages**

Mary Ângela Aranda-Souza^{a*}, Virginia Maria Barros de Lorena^b, Maria Tereza dos Santos Correia^c, Antonio Pereira-Neves^{a#}, Regina Celia Bressan Queiroz de Figueiredo^{a#}

^a Departamento de Microbiologia, Instituto Aggeu Magalhães (IAM-FIOCRUZ), Av. Professor Moraes Rego s/n, 50670-420, Recife, Brazil ^b Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães (IAM-FIOCRUZ), Av. Professor Moraes Rego s/n, 50670-420, Recife, Brazil ^c Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Professor Moraes Rego s/n, 50670-420, Recife, Brazil

*Corresponding author

Mary Ângela Aranda-Souza
Departamento de Microbiologia
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ
Av. Moraes Rego s/n – Campus da UFPE
Cidade Universitária, Recife
Pernambuco, Brasil
50670-420
E-mail addresses: maryaranda88@gmail.com

These authors equally contributed to the paper.

Abstract

Lectins are carbohydrate-binding proteins that play important role in immune system. Under specific conditions, lectins can form amyloids, proteinaceous aggregates rich in cross β -strand structures. A Ca^{++} -dependent lectin, isolated from *Bothrops leucurus* snake venom (BLL) has been demonstrating relevant biological activities as antibacterial and antitumor activity. In this work, we aimed to study the interaction of BLL with macrophages. The formation of amyloid structures by BLL in cell culture medium, the effects of the lectin on the macrophage morphology and cytokines production were investigated. BLL amyloid-like fibrils in RPMI medium, pH 7.2, at 37°C was confirmed by binding of Congo Red, Thioflavin T and electron microscopy. Neither binding of amyloid markers nor fibrillar structures were found when the lectin was incubated in RPMI plus galactose, the specific BLL binding carbohydrate. Several phagocytic compartments containing fibrillar structures were observed in BLL-treated macrophages in RPMI medium for 24h; these compartments showed an apple-green birefringence after Congo Red staining and were positive for thioflavin S and anti-amyloid antibody, indicating the presence of amyloid-like fibrils. No fibrillar material and no labeling were observed when the macrophages were treated with BLL plus galactose or cytochalasin B, an inhibitor of phagocytosis. BLL did not affect the viability of the cells. A significant release of proinflammatory (TNF- α , IL-6, INF- γ and IL-1 β) and regulatory (IL-10) cytokines was observed in BLL-treated macrophages. Taken together our results shedding light on the structural organization of BLL improving the knowledge about the interaction of lectin with macrophages. The phagocytosis of amyloid-like aggregates together with the proinflammatory response induced by BLL may open new perspectives for the use of this lectin as an interesting model to study cytokines and others mediators production and understand the mechanisms occurring in human immune cells during amyloid protein deposition.

Keywords: lectin, aggregation, amyloid-like fibrils, macrophage, immunomodulation

1 Introduction

C-type lectins (CTLs) are the largest and most diverse carbohydrate-binding proteins found in animals, playing relevant role in cell signaling, innate immunity, differentiation and cell adhesion. In the human immune system, CTLs induce secretion of innate cytokines and other immune mediators modulating inflammation and immunity (van den Berg et al., 2012; Chiffolleau, 2018; Patin et al., 2017). These lectins are Ca^{++} -dependent glycan-binding proteins that share primary and secondary structural homology in their carbohydrate recognition domains. One of most interesting features of lectins is its ability to form oligomers, increasing their affinity for multivalent ligands (Cummings and McEver, 2009).

Snake venoms are complex combination of bioactive proteins and polypeptides, including CTLs, that act on specific biochemical and physiological targets being considered for research and biotechnological development (Boldrini-França et al., 2017; Fry et al., 2008 proteins Doley et al., 2009). In this context, the galactoside-binding CTL purified from *Bothrops leucurus* (BLL) snake venom is a β -class protein of 30 kDa composed of two subunits of 15 kDa. Previous studies have demonstrated that BLL has biological activity against Gram-positive bacteria (Nunes et al., 2011), tumor cell lines (Aranda-Souza et al., 2014; Nunes et al., 2012a) and protists parasites from genus *Leishmania* (unpublished data). The varied and relevant biological activities of BLL make this protein an excellent model of study on different research fields, such as cell signaling, cell differentiation, production of cytokines and other mediators. However, the effects of BLL on cells from immune system, such as macrophage are unknown.

The activity of proteins, including CTLs, is intrinsically related to their conformational and structural organization (Drickamer and Taylor, 2015). The intimate relationship existing between the structure and activity of lectin proteins remains unclear and subject of interest in several research fields, from food science to biotechnology. Additionally, previous studies have demonstrated that under some environmental conditions, lectins, as Concanavalin A (ConA), can undergo unfolding and/or aggregation processes and form amyloid fibrils (Khan et al., 2018; Vetri et al., 2011; Carrotta et al., 2012; Khan et al., 2018). Amyloids are highly ordered fibrillar protein aggregates with a cross β -sheet structure and an ability to self-assemble from their monomeric counterparts in a nucleation-dependent process (Buell, 2017;

Uversky and Fink, 2004; Bemporad and Ramazzotti, 2017). Amyloid fibrils have long been linked with devastating human neurodegenerative disorders and numerous other diseases, including Alzheimer's and Parkinson's disease (Dobson, 2003; Hardy and Selkoe, 2002). However, amyloid structures also contribute to many biologically relevant functions in bacteria, fungi, insects and humans, so-called functional amyloids (Phan et al., 2014).

Given the role of CTLs on the cells from immune system and the biological activity of BLL, the aim of this work was to study the interaction of BLL with macrophages. Because lectins can form amyloid fibrils in vitro, we first investigated the aggregation behavior of BLL under cell culture medium condition and next analyzed the effects of the lectin on the macrophage morphology and cytokines production.

2 Material and Methods

2.1 Lectin preparation

B. leucurus venom was kindly supplied by Dra. Miriam Camargo Guarnieri, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil. The lectin was purified according to the protocol previously described by Nunes et al. (2011). Briefly, lyophilized crude venom of *B. leucurus* (30 mg) was dissolved in 1 mL of CTBS buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl and 5 mM CaCl₂, pH 7.5) and centrifuged (2000 g, 5 min, 25 °C) to remove insoluble material. The resulting supernatant was applied to a column (10 x 1.0 cm) of guar gel previously equilibrated with CTBS at a flow rate of 10 mL/h. BLL was eluted from the column with 200 mM galactose in CTBS. Protein concentration was determined according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as a standard.

2.2 Congo Red and thioflavin T binding assays

Fibril formation was assessed using Thioflavin-T (ThT) and Congo Red (CR) binding assays. For both assays, 1 µM BLL was incubated in RPMI medium, pH 7.2, at 37 °C with 5% CO₂, for different times (0 – 120 minutes). After each time, aliquots were taken and incubated with 25 µM ThT and 50 µM CR according Sulatskaya et al. (2018). The ThT fluorescence was measured using a GloMax® Fluorimeter (Promega Corporation, USA) with excitation at 450 nm and emission at

465–520 nm (LeVine, 1993). For CR, BLL was prepared as described above. The CR absorbance was read between 400 and 700 nm, the CR spectrum was mathematically subtracted from the BLL CR spectrum and a maximal spectral difference at 540 nm was considered indicative of amyloid-like fibrils.

2.3 Negative staining of BLL

To examine the morphology of the protein/peptide amyloid-like fibrils, BLL was incubated in RPMI medium as described in the section 2.2. After each incubation time, samples were centrifuged at 14000 rpm for 20 min and the pellet was resuspended in 10 μ L of PBS to avoid the precipitation of culture medium components. Next, 5 μ L of the sample was applied to Alcian blue-treated carbon coated grid for 2 min and negatively stained with 1% uranyl acetate for 1 min. The grids were then air-dried and observed with a Tecnai FEI spirit transmission electron microscope, operating at 120kV.

2.4 Cell culture

Peritoneal macrophages, obtained from Balb/c mice, were plated at 5×10^5 cells/well in RPMI medium supplemented with 10% bovine fetal serum and 100 IU/mL penicillin, at 37 °C with 5% CO₂. For detection of amyloid-like fibrils in macrophage cultures treated or not with BLL, the cells were seeded at 5×10^6 cells/well in 24-well culture plates containing a glass coverslips in the bottom and submitted to ThT and CR staining as described in the sub item 2.7 and 2.8.

2.5 Cytotoxicity Assay

Macrophages from Balb/c mice were plated at 5×10^5 cells/well in 96-well plate containing 100 μ L of RPMI medium, supplemented with 10% FBS, and maintained for 3 h at 37 °C in 5% CO₂. Next, the adhered macrophages were incubated in the presence or absence of several concentrations of BLL (0.25 – 4 μ M) in RPMI for 24 h. The cells were washed with RPMI without phenol red and incubated in the same medium containing 5 mg/mL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), for an additional 3 h at 37 °C. Afterwards, the medium was discarded and 100 μ L/of DMSO was added to each well to solubilize the colored formazan product formed. Absorbance was read at 540 nm on a GloMax® Spectrophotometer (Promega Corporation, USA). Each assay was carried

out in triplicate in three independent experiments.

2.6 Ultrastructural analyses of macrophages

Macrophages seeded in 6-well culture plates at 5×10^5 cells/well were treated or not with 1 μ M BLL or BLL plus 200mM galactose in RPMI medium at 37 °C in 5% CO₂ for 24h. Then, the cells were washed in PBS, pH 7.2, and fixed in 2.5% glutaraldehyde plus 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2, for 1 h at 25 °C. The cells were then post-fixed in 1% O₄ for 1h. Subsequently, the cells were scraped, harvested by centrifugation at 3000 rpm for 5 min, dehydrated in graded acetone series and embedded in Epon (Polybed 812.) Ultrathin sections were stained with 5% uranyl acetate and 1% lead citrate and observed in Tecnai FEI spirit transmission electron microscope, operating at 120kV.

2.7 Congo Red staining in macrophages

Macrophages were stained with Congo Red as described by Okada et al. (2007) with modifications. Briefly, macrophages treated or not with 1 μ M BLL were washed twice with PBS and fixed in 4 % paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2, for 2h at 25 °C . Next, cells were washed twice with PBS and permeabilized with 1% Triton for 10 min. The samples were incubated in a solution containing 0.5 M NaCl (diluted in 80% ethanol) and 1% NaOH (freshly prepared) for 2 h, stained with 2.8 mM Congo Red for 1 h and washed twice with distilled water. The images were acquired using a Leica DMI4000 B microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

2.8 Thioflavin S (ThS) staining in macrophages

BLL-treated and untreated macrophages were washed twice with PBS and fixed in 4 % paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.2, for 2H at 25 °C. The cells were washed twice with PBS, permeabilized with 1% Triton for 10 min, and stained with 0.1 % ThS (freshly diluted in PBS and filtered in 0.22 μ m sterile syringe filters) for 1 h. Next, the cells were washed with 70% ethanol and counter-stained with Hoechst 33258 solution according to the manufacturer's instructions. The images were acquired in SPM AOBS confocal microscope using 488 nm laser for ThS and UV for Hoechst 33258.

Alternatively, the cells were pre-treated with 1 mM 3-methyladenine (autophagy inhibitor) and 2.5 μ M Cytochalasin B (CytB, phagocytosis inhibitor) 30 min before BLL treatment and then submitted to ThS staining.

2.9 Immunogold electron microscopy

BLL treated and untreated macrophages were processed for transmission electron microscopy, as described above. For immunolabelling, thin sections were etched with 0.1% hydrogen peroxide for 10 min and quenched in 50 mM ammonium chloride, 3% and 1% PBS/BSA, and 0.2% Tween-20. Next, the samples were incubated with the anti-amyloid fibrils LOC antibody (Merck) (dilution: 1:50) for 48h at 4°C. After several washes, the thin sections were incubated with 10 nm gold-labelled goat anti-rabbit IgG (BB International, UK) for 2 h at room temperature in the dark, washed in distilled water and observed using a Tecnai FEI spirit transmission electron microscope, operating at 120kV. In some assays, the primary antibodies were omitted, and the samples were incubated only with the gold-labelled goat anti-rabbit antibody. No labelling was observed under this condition.

2.10 Cytokine determination in culture supernatants

To evaluate the cytokine release by macrophage treated or not with BLL or treated with BLL plus galactose, supernatants of cultures were stained utilizing BD CBA Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD Bioscience, Sao Paulo, Brazil) according to the manufacturer's instructions. The supernatants were stained with capture beads containing antibodies specific for IL-1 β , IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α and IL-10 proteins for 2 h. After labelling, suspensions were washed twice with BD Wash Buffer and centrifuged for 200 g for 5 minutes. Beads were then suspended with 300 μ L of BD Wash Buffer. Data acquisition and analysis were performed using the BD CellQuestTM Pro software and FCAP Array v.3 (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, USA), respectively after collecting a minimum of 2100 events/sample.

2.11 Ethical considerations

The present study was carried out in accordance with the ethical principles adopted by Brazilian law 11.794/2008 and approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Instituto Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (Nº 77/2014).

2.12 Statistical analysis

Differences among groups were assessed by one-way ANOVA and Student's *t* test and Bonferroni post-test. The significance level was set at $P < 0.05$. All tests were performed using the software GraphPrisma (GraphPad Software, 5.03). Data are presented as means \pm standard deviation (SD).

3 Results and Discussion

Our group have previously demonstrated relevant biological activities of BLL as antibacterial (Nunes et al., 2011), antitumor (Aranda-Souza et al., 2014; Nunes et al., 2012a) and antiparasitic agents (Aranda-Souza et al., 2018). The present study was focused on investigating the interaction of BLL with macrophages because we are interested in the potential of the lectin as a useful tool to modulate of inflammation and immunity. The biological role and physical properties of lectins, including its mechanical stability and carbohydrate-binding activity stability have proven to be related to the structural arrangement of these proteins. Previous studies showed that lectins can form amyloid aggregates under specific in vitro conditions (Vetri et al., 2011; Vetri et al., 2010). Because BLL possess a large amount of β -sheet structures (Nunes et al., 2011), which favors the aggregates and amyloid-like fibrils formation (Nowick, 2008), we first investigated the effects of cell culture medium conditions (RPMI medium, pH 7.2 and at 37°C) on the aggregation behavior of BLL. The time course of BLL aggregation in RPMI medium was monitored using ThT and CR, which are considered to be highly specific for amyloid-like structure (Chiti and Dobson, 2017). Our results showed a time-dependent increase of ThT fluorescence emission in BLL/RPMI sample when compared with BLL-free RPMI (Fig. 1A). BLL/RPMI sample was also found to bind CR, causing a red shift in the absorbance spectrum (Fig. 1B). Negatively-stained electron microscopy images of BLL/RPMI samples showed fibrillar material in 15 minutes of incubation (Fig. 1C). Taken together, these data indicate that BLL forms

amyloid-like aggregates in RPMI medium under cell culture conditions. Nunes and colleagues (2011) demonstrated that BLL activity was completely abolished in the presence of galactose, lactose and raffinose, indicating that BLL is a galactoside-binding protein. To investigate whether the formation of amyloid-like structures in BLL/RPMI samples could be affected by specific lectin binding carbohydrate, BLL was incubated in culture medium with 200 mM galactose. Our results showed that in the presence of the carbohydrate, both ThT fluorescence and CR absorbance signal were inhibited, indicating that galactose partially impairs the BLL aggregation into amyloid-like fibrils (Fig. 1A and B).

Macrophages are immunocompetent cells involving in defense of organisms against pathogen infections and other harmful stimulus. These cells are also particularly important in the clearance of A β peptides from brain and other tissues by a variety of phagocytic and digestive mechanisms (Aaron and McLaurin, 2012). In this regard, we further investigated the effect of BLL on peritoneal macrophages morphology and viability. BLL-treated macrophages for 24h showed several cytoplasmic structures, containing electrondense fibrillar material (Fig. 2A, 2C and 2D) similar to phagosomes (electronlucent matrix) or phagolysosomes (electrondense matrix). In contrast, no fibrillar material was observed in BLL/galactose-treated (Fig 2B) and untreated (Fig 2E) cells. However, several electronlucent vesicles was noted in BLL/galactose-treated macrophages (Fig. 2B).

To investigate whether the fibrillar structures found in the macrophages could be the amyloid-like aggregates formed by BLL, lectin-treated cells for 24 hours were submitted to CR (Fig. 3) and ThS (Fig. 4) staining, and immunolabeling using anti-amyloid fibrils LOC antibody (Fig. 5). A green birefringence under polarized light was observed in the cell surface and some intracellular structures after CR staining, indicating the presence of amyloid-like fibrils (Fig 3). In addition, BLL-treated cells also exhibited an intracellular positive labeling for ThS (Fig. 4). Moreover, after immunogold labeling using anti-amyloid antibody, gold particles were seen on the fibrillar structures inside vesicles from BLL-treated macrophages (Fig. 5). No birefringence, ThS and antibody labeling were observed in control and BLL+ Galactose-treated cells, suggesting that the amyloid-like structures formed by BLL in RPMI could be phagocytized by macrophages. (Fig. 3-4). However, Takahashi and colleagues (1989) reported that some amyloid fibrils may be formed in the cytoplasm of the macrophages by the proteolytic cleavage of a previously endocytosed protein. To exclude the

hypothesis that BLL amyloid-like fibrils could be also formed inside the macrophages rather than to be phagocytized, cells were pre-treated with 3-MA (inhibitor of autophagic vesicles) and Cytochalasin B (CytB, inhibitor of phagocytosis) 30 min before BLL treatment and then labeled for ThS (Fig. 4). In contrast to BLL-untreated and 3-MA-pretreated cells, no significant labeling was found after pretreatment with CytB (Fig. 4). Additionally, immunogold electron microscopy revealed the presence of extracellular fibrous material positively labeled for anti-amyloid antibody close to plasma membrane and pseudopods of macrophages (Fig. 5). Taken together, these results indicate that BLL amyloid-like aggregates may be formed extracellularly and are efficiently phagocytosed by peritoneal macrophages (Fig. 5). The role of phagocytosis in the clearance of amyloid structures has been well recognized in the literature. The microglia cells, for instance, upon insult or stress are activated and stimulated to migrate up to the site of lesion and remove cell debris and A β amyloid from the brain (Mizuno, 2012; Morgan and Gordon, 2008). Studies on Alzheimer's disease have demonstrated that microglia and invading marrow-derived mononuclear macrophages have pivotal role on the initiation and progression of disease. Activated microglia is able to perform macrophage-like functions including cytokine release and phagocytosis (Aaron and McLaurin, 2012). In macrophages, diverse studies suggested that the phagocytosis of A β is decreased in patients with Alzheimer disease (AD) leading to amyloid accumulation in the brain and worsening the clinical condition of patients (Guillot-Sestier et al., 2016; Jones et al., 2014; Mizwicki et al., 2012). In this sense, BLL could be an interesting and relevant system to understand the mechanisms occurring in human with amyloid protein deposition, i.e. A β amyloid, in macrophages. However, further studies are needed to determine this.

Regarding the lectin-derived aggregates, the ConA-derived amyloid structures were related with cytotoxicity activity on neoplastoma cells (Vetri et al., 2010). Importantly, BLL amyloid-like structures did not affect the viability of the cells, as revealed by ultrastructure and MTT assays (Fig. 2). - Savchenko and colleagues (2016) showed that the amyloids might exert effect on the cellular signalling, reactive oxygen species (ROS), nitric oxide (NO) and cytokine production without prejudice the function and viability of phagocytic cells.

Over the last decade, CTLs have gained increasing attention for their role in coordinating innate and adaptive immunity, in part, through the induction and modulation

of cytokine responses (Chiffolleau, 2018; Shiokawa et al., 2017; Vautier et al., 2012). To investigate whether BLL treatment has also an immunomodulatory effect on macrophages, we analyzed a cytokine profile from the cell culture supernatants. A significant release of proinflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and INF- γ were observed in BLL-treated cells as compared with non-treated cells (Fig. 6). The relationship between the aggregation/monomeric state of proteins and their immunomodulatory activity has already reported in the literature. For instance, structural modifications on bothropstoxin-1, component of *Bothrops jararacussu* snake venom characterized as aggregates and oligomers, were related to the stimulation on the pro and anti-inflammatory immune response in macrophages (Caproni et al., 2009). Previous studies have demonstrated that the overexpression of IL-6 in mice was highly effective in preventing amyloid plaque deposition. This effect was accompanied by the up-regulation of phagocytic markers *in vivo* and enhanced phagocytosis of aggregates *in vitro* (Verbeeck et al., 2017; Chakrabarty et al., 2010). Other authors still suggest that in presence of amyloid stimulation, peripheral TNF- α may promote the migration of inflammatory cell populations involved in amyloid clearance in an up-regulation process (Paouri et al., 2017).

Our results also demonstrated a significant enhancement of IL-1 β secretion in cells treated with BLL. (Fig. 6B) This cytokine is produced as inactive precursor pro-IL1 β in the cytosol after cell activation by a variety of stimulus, including amyloid fibrils. The enzymatic cleavage of pro-IL-1 β to its active form is dependent on the recruitment of caspase-1 in a multiprotein complex namely inflammasomes. Among the best-known inflammasomes, the NLRP3 can be activated by nonmicrobial and microbial stimuli (Lamkanfi et al., 2014). The increased production of IL-1 β observed in our study suggests that BLL could activate NLRP3 inflamassome via Toll-like receptor recognition (Oleszycka et al., 2016). Previous study by Araújo et al (2013) have demonstrated that the lectins cMoL (coagulant *M. oleifera* lectin) and WSMoL (water-soluble *M. oleifera* lectin) from *Moringa oleifera* seeds were able to modulated the production of IL-1 β in different way. Whereas isolated cMoL, the aqueous and the diluted seed extracts reduced the secretion of this cytokine by murine macrophages stimulated with LPS, an increased production of IL-1 β was observed in cells treated with WSMoL. IL-1 β is released by activated microglia being overexpressed in cells surrounding A β plaques and cerebrospinal fluids in Alzheimer's patients (Halle et al., 2008). The

activation of the NLRP3 inflammasome by bacterial amyloids suggested that amyloid structures might stimulate the TLR2/TLR1 heterocomplex, leading to phagocytosis of the aggregates and activation of NLRP3, caspase1 and NF κ B resulting in the expression of proinflammatory cytokines, including pro-IL-1 β and IL-6 (Rapsinski et al., 2015). Among the regulatory cytokines analyzed, only IL-10 was significantly increased in BLL-treated cells (Fig. 6E). Although phagocytosis may provide the initial antigen stimulus for cytokine secretion, is important keep in mind that the secretion of some cytokine as IFN- γ by macrophages can be influenced by other cells present in peritoneal exudate in less extent (Darwich et al., 2009). The simultaneous incubation of macrophages with BLL and galactose decreased the cytokine production to basal level found in untreated cells. As galactose has demonstrated to prevent the aggregation of BLL, our results suggested that the proinflammatory response could be dependent of the aggregate/monomeric state of this lectin, as well as, its ability to be recognized and/or uptaken by macrophages.

Taken together, the present study gives a new insight about the effect of BLL- on the macrophage immune response. The understand of the nature of BLL amyloid-like formation could be a useful model to study not only the immunomodulatory response induced by amyloids, but also the study cell signaling, cell differentiation, cytokines and others mediators production. BLL might form amyloid-like aggregates that could be possibly recognized by Toll-like receptors or other scavenger receptors in the cell surface being efficiently phagocytized by peritoneal macrophages. When interiorized, this lectin induces the production of proinflammatory interleukin triggering the immune response against the amyloid stimulus. The amyloid-like state of BLL observed here could be related to its antitumor, antimicrobial and immunomodulatory activities previously reported (Aranda-Souza et al., 2014; Nunes et al., 2012a; Nunes et al., 2011). Furthermore, the intense phagocytosis of BLL as well as the stimulation of proinflammatory cytokine release by these cells open new perspectives for the use of BLL as a tool for understanding the mechanisms of recognition, signaling and response of macrophages to amyloid protein deposition.. However, further studies are in course to investigate this.

Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco (APQ/FACEPE 0584-2.13/15). Aranda-Souza is a PhD student supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) in cooperation with FIOCRUZ on Brasil sem Miséria fellowship.

Reference

Aaron, Y.L., McLaurin, J., 2012. Clearance of amyloid- β peptides by microglia and macrophages: the issue of what, when and where. *Future Neurol.* 7(2): 165–176.

Aranda-Souza MA, de Lorena VMB, Dos Santos Correia MT, de Figueiredo RCBQ. *In vitro* effect of *Bothrops leucurus* lectin (BLL) against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis* infection. *Int J Biol Macromol.* 2018. pii: S0141-8130(18)33354-3. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.08.064.

Aranda-Souza, M.A., Rossato, F.A., Costa, R.A., Figueira, T.R., Castilho, R.F., Guarniere, M.C., Nunes, E.S., Coelho, L.C., Correia, M.T.S., Vercesi, A.E., 2014. A lectin from *Bothrops leucurus* snake venom raises cytosolic calcium levels and promotes B16-F10 melanoma necrotic cell death via mitochondrial permeability transition. *Toxicon.* 82:97-103. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.02.018.

Araújo LC, Aguiar JS, Napoleão TH, Mota FV, Barros AL, Moura MC, Coriolano MC, Coelho LC, Silva TG, Paiva PM. Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. *PLoS One.* 2013. 8(12):e81973. doi: 10.1371/journal.pone.0081973

Bemporad F. and Ramazzotti, M., 2017. From the Evolution of Protein Sequences Able to Resist Self-Assembly to the Prediction of Aggregation Propensity. *Int Rev Cell Mol Biol.* 329:1-47. doi: 10.1016/bs.ircmb.2016.08.008

Boldrini-França, J., Cologna, C.T., Pucca, M.B., Bordon, K.C., Amorim, F.G., Anjolette, F.A., Cordeiro, F.A., Wiezel, G.A., Cerni, F.A., Pinheiro-Junior, E.L., Shibao, P.Y., Ferreira, I.G., de Oliveira, I.S., Cardoso, I.A., Arantes, E.C., 2017. Minor

snake venom proteins: Structure, function and potential applications. *Biochim Biophys Acta*. 1861(4):824-838. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.12.022.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72:248-54.

Buell, A.K., 2017. The Nucleation of Protein Aggregates - From Crystals to Amyloid Fibrils. *Int Rev Cell Mol Biol*. 329:187-226. doi: 10.1016/bs.ircmb.2016.08.014.

Caproni, P., Baptista, J.A., Almeida, T.L., Passos, L.A.C., Nascimento, N., 2009. Study of irradiated bothropstoxin-1 with ⁶⁰Co gamma rays: immune system behavior. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis*. 15, 216–225.

Carrotta, R., Vilasi, S., Librizzi, F., Martorana, V., Bulone, D., San Biagio, P.L., 2012. α -Casein Inhibition Mechanism in Concanavalin A Aggregation Process *J. Phys. Chem. B*. 116 (50) 14700–14707.

Chakrabarty, P., Jansen-West, K., Beccard, A., Ceballos-Diaz, C., Levites, Y., Verbeeck, C., Zubair, A.C., Dickson, D., Golde, T.E., Das, P., 2010. Massive gliosis induced by interleukin-6 suppresses Abeta deposition in vivo: evidence against inflammation as a driving force for amyloid deposition. *FASEB J*. 24(2):548-59. doi:10.1096/fj.09-141754.

Chiffolleau E. C-Type Lectin-Like Receptors As Emerging Orchestrators of Sterile Inflammation Represent Potential Therapeutic Targets. *Front Immunol*. 2018. 9:227. doi: 10.3389/fimmu.2018.00227.

Chiti, F. and Dobson, C.M., 2017. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu Rev Biochem*. 75: 333-366. doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-045115.

Cummings, R.D. and McEver, R.P., 2009. C-type lectins. In Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al. (edit.). *Essentials of Glycobiology* [Internet] Cold Spring Harbor (NY). Chapter 34.

Darwich, L., Coma, G., Peña, R., Bellido, R., Blanco, E.J., Este, J.A., Borrás, F.E., Clotet, B., Ruiz, L., Rosell, A., Andreo, F., Parkhouse, R.M., Bofill, M., 2009. Secretion of interferon-gamma by human macrophages demonstrated at the single-cell level after costimulation with interleukin (IL)-12 plus IL-18. *Immunology*. 126(3):386-93. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02905.x.

Davidson DS, Brown AM, Lemkul JA. Insights into Stabilizing Forces in Amyloid Fibrils of Differing Sizes from Polarizable Molecular Dynamics Simulations. *J Mol Biol*. 2018. pii: S0022-2836(18)30444-3. doi: 10.1016/j.jmb.2018.05.020.

Dobson, C.M., 2003. Protein folding and misfolding. *Nature*. 18;426(6968):884-90. doi:10.1038/nature02261

Doley, R., Kini, R.M., 2009. Protein complexes in snake venom. *Cell. Mol. Life Sci*. 66, 2851–2871. Drickamer, K. and Taylor, M.E., 2015. Recent insights into structures and functions of C-type lectins in the immune system. *Curr Opin Struct Biol*. 34:26-34. doi: 10.1016/j.sbi.2015.06.003.

Fry, B.G., Scheib, H., van der Weerd, L., Young, B., McNaughtan, J., Ramjan, S.F., Vidal, N., Poelmann, R.E., Norman, J.A., 2008. Evolution of an arsenal: structural and functional diversification of the venom system in the advanced snakes (Caenophidia). *Mol Cell Proteomics*. 7(2):215-46. doi: 10.1074/mcp.M700094-MCP20

Guillot-Sestier, M.V., Weitz, T.M., Town, T., 2016. Quantitative 3D In Silico Modeling (q3DISM) of Cerebral Amyloid-beta Phagocytosis in Rodent Models of Alzheimer's Disease. *J Vis Exp*. 26;(118). doi: 10.3791/54868.

Halle, A., Hornung, V., Petzold, G.C., Stewart, C.R., Monks, B.G., Reinheckel, T., Fitzgerald, K.A., Latz, E., Moore, K.J., Golenbock, D.T., 2008. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol*. 9(8):857-65. doi: 10.1038/ni.1636.

Hardy, J. and Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 19;297(5580):353-6. doi:10.1126/science.1072994

Jones, S., Asokanathan, C., Kmiec, D., Irvine, J., Fleck, R., Xing, D., Moore, B., Parton, R., Coote, J., 2014. Protein coated microcrystals formulated with model antigens and modified with calcium phosphate exhibit enhanced phagocytosis and immunogenicity. *Vaccine*. 16;32(33):4234-42. doi: 10.1016/j.vaccine.2013.09.061.

Khan MV, Ishtikhar M, Siddiqui MK, Zaman M, Chandel TI, Majid N, Ajmal MR, Abdelhameed AS, Shahein YE, Khan RH. Biophysical insight reveals tannic acid as amyloid inducer and conformation transformer from amorphous to amyloid aggregates in Concanavalin A (ConA). *J Biomol Struct Dyn*. 2018. 36(5):1261-1273. doi: 10.1080/07391102.2017.1318718.

Lamkanfi, M., Dixit, V.M., 2014. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*. 157(5):1013-22.

LeVine, H., 1993. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci*. 2: 404–410. doi: 10.1002/pro.5560020312

Luna L. *Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. 3rd ed., New York, NY: McGraw-Hill; 1968, 336–373.

Mizuno, T., 2012. The biphasic role of microglia in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis*. 2012:737846. doi: 10.1155/2012/737846.

Mizwicki, M.T., Menegaz, D., Zhang, J., Barrientos-Durán, A., Tse, S., Cashman, J.R., Griffin, P.R., Fiala, M., 2012. Genomic and nongenomic signaling induced by 1 α ,25(OH)₂-vitamin D₃ promotes the recovery of amyloid- β phagocytosis by Alzheimer's disease macrophages. *J Alzheimers Dis*. 29(1):51-62. doi: 10.3233/JAD2012-110560.

Morgan, D. and Gordon, M.N., 2008. Amyloid, hyperactivity, and metabolism: theoretical comment on Vloeberghs et al. (2008). *Behav Neurosci*. 122(3):730-2. doi:10.1037/0735-7044.122.3.730.

Nowick, J.S., 2008. Exploring beta-sheet structure and interactions with chemical model systems. *Acc Chem Res*. 41(10):1319-30. doi: 10.1021/ar800064f.

Nunes, E.S., Aranda-Souza, M.A., Vaz, A.F., Coelho, L.C.B.B., Aguiar, J.S., Silva, T.G., Guarnieri, M.C., Melo, A.M.M.A., Oliva, M.L.V., Correia, M.T.S., 2012b. Inactivation and fragmentation of lectin from *Bothrops leucurus* snake venom by gamma irradiation. *Radiation Physics and Chemistry*. 81:484–487. doi.org/10.1016/j.radphyschem.2011.12.048

Nunes, E.S., Aranda-Souza, M.A., Vaz, A.F., Santana, G.M., Gomes, F.S., Coelho, L.C., Paiva, P.M., da Silva, R.M., Silva-Lucca, R.A., Oliva, M.L., Guarnieri, M.C., Correia, M.T.S., 2011. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 159(1):57-63. doi: 10.1016/j.cbpb.2011.02.001

Nunes, E.S., Aranda-Souza, M.A., Vaz, A.F., Silva, T.G., Aguiar, J.S., Batista, A.M., Guerra, M.M., Guarnieri, M.C., Coelho, L.C.B.B., Correia, M.T.S., 2012a. Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. *Toxicol*. 1;59(7-8):667-71. doi: 10.1016/j.toxicol.2012.03.002.

Okada, T., Wakabayashi, M., Ikeda, K., Matsuzaki, K., 2007. Formation of toxic fibrils of Alzheimer's amyloid β -protein-(1–40) by monosialoganglioside GM1, a neuronal membrane component. *J Mol Biol*. 371:481–489. doi: 10.1016/j.jmb.2007.05.069

Okoshi, T., Yamaguchi, I., Ozawa, D., Hasegawa, K., Naiki, H., 2015. Endocytosed 2-Microglobulin Amyloid Fibrils Induce Necrosis and Apoptosis of Rabbit Synovial Fibroblasts by Disrupting Endosomal/Lysosomal Membranes: A Novel Mechanism on the Cytotoxicity of Amyloid Fibrils. *PLoS One*. 30;10(9):e0139330. doi: 10.1371/journal.pone.0139330.

Oleszycka, E., Moran, H.B., Tynan, G.A., Hearnden, C.H., Coutts, G., Campbell, M., Allan, S.M., Scott, C.J., Lavelle, E.C., 2016. IL-1 α and inflammasome-independent IL-1 β promote neutrophil infiltration following alum vaccination. *FEBS J*. 283(1):9-24.

Paouri, E., Tzara, O., Kartalou, G.I., Zenelak, S., Georgopoulos, S., 2017. Peripheral Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α) Modulates Amyloid Pathology by Regulating Blood-Derived Immune Cells and Glial Response in the Brain of AD/TNF Transgenic Mice. *J Neurosci*. 17;37(20):5155-5171. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2484-16.2017.

Patin EC, Orr SJ, Schaible UE. Macrophage Inducible C-Type Lectin As a Multifunctional Player in Immunity. *Front Immunol.* 2017. 8:861. doi: 10.3389/fimmu.2017.00861.

Pham, C.L., Kwan, A.H., Sunde, M., 2014. Functional amyloid: widespread in Nature, diverse in purpose. *Essays Biochem.* 56:207-19. doi: 10.1042/bse0560207.

Rapsinski, G.J., Wynosky-Dolfi, M.A., Oppong, G.O., Tursi, S.A., Wilson, R.P., Brodsky, I.E., Tükel, Ç., 2015. Toll-like receptor 2 and NLRP3 cooperate to recognize a functional bacterial amyloid, curli. *Infect Immun.* 83(2):693-701. doi:10.1128/IAI.02370-14.

Savchenko, E., Malm, T., Konttinen, H., Hämäläinen, R.H., Guerrero-Toro, C., Wojciechowski, S., Giniatullin, R., Koistinaho, J., Magga, J., 2016. A β an Inflammatory Stimulus Activate Diverse Signaling Pathways in Monocytic Cells: Implications in Retaining Phagocytosis in A β -Laden Environment. *Front Cell Neurosci.* 5;10:279. doi: 10.3389/fncel.2016.00279.

Shiokawa M, Yamasaki S, Saijo S. C-type lectin receptors in anti-fungal immunity. *Curr Opin Microbiol.* 2017. 40:123-130. doi: 10.1016/j.mib.2017.11.004.

Sulatskaya AI, Rodina NP, Sulatsky MI, Povarova OI, Antifeeva IA, Kuznetsova IM, Turoverov KK. Investigation of α -Synuclein Amyloid Fibrils Using the Fluorescent Probe Thioflavin T. *Int J Mol Sci.* 2018. 19(9). pii: E2486. doi: 10.3390/ijms19092486.

Takahashi, M., Yokota, T., Kawano, H., Gondo, T., Ishihara, T., Uchino, F., 1989. Ultrastructural evidence for intracellular formation of amyloid fibrils in macrophages. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 415(5):411-9.

Uversky, V.N. and Fink, A.L., 2004. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. *Biochim Biophys Acta.* 698(2):131-53. doi: 10.1016/j.bbapap.2003.12.008

van den Berg LM, Gringhuis SI, Geijtenbeek TB. An evolutionary perspective on C-type lectins in infection and immunity. *Ann N Y Acad Sci.* 2012. 1253:149-58. doi: 10.1111/j.1749-6632.2011.06392.x

Vautier S, MacCallum DM, Brown GD. C-type lectin receptors and cytokines in fungal immunity. *Cytokine*. 2012. 58(1):89-99. doi: 10.1016/j.cyto.2011.08.031.

Verbeeck, C., Carrano, A., Chakrabarty, P., Jankowsky, J.L., Das, P., 2017. Combination of A β Suppression and Innate Immune Activation in the Brain Significantly Attenuates Amyloid Plaque Deposition. *Am J Pathol*. 15. pii: S0002 9440(17)30493-5. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.08.010.

Vetri, V., Ossato, G., Militello, V., Digman, M.A., Leone, M., Gratton, E., 2011. Fluctuation methods to study protein aggregation in live cells: concanavalin A oligomers formation. *Biophys J*. 2;100(3):774-83. doi: 10.1016/j.bpj.2010.11.089.

Vetri, V., Carrotta, R., Picone, P., Di Carlo, M., Militello, V., 2010. Concanavalin A aggregation and toxicity on cell cultures. *Biochim Biophys Acta*. 1804(1):173-83. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.09.013.

Wang Y, Pu J, An B, Lu TK, Zhong C. Emerging Paradigms for Synthetic Design of Functional Amyloids. *J Mol Biol*. 2018. pii: S0022-2836(18)30246-8. doi: 10.1016/j.jmb.2018.04.012.

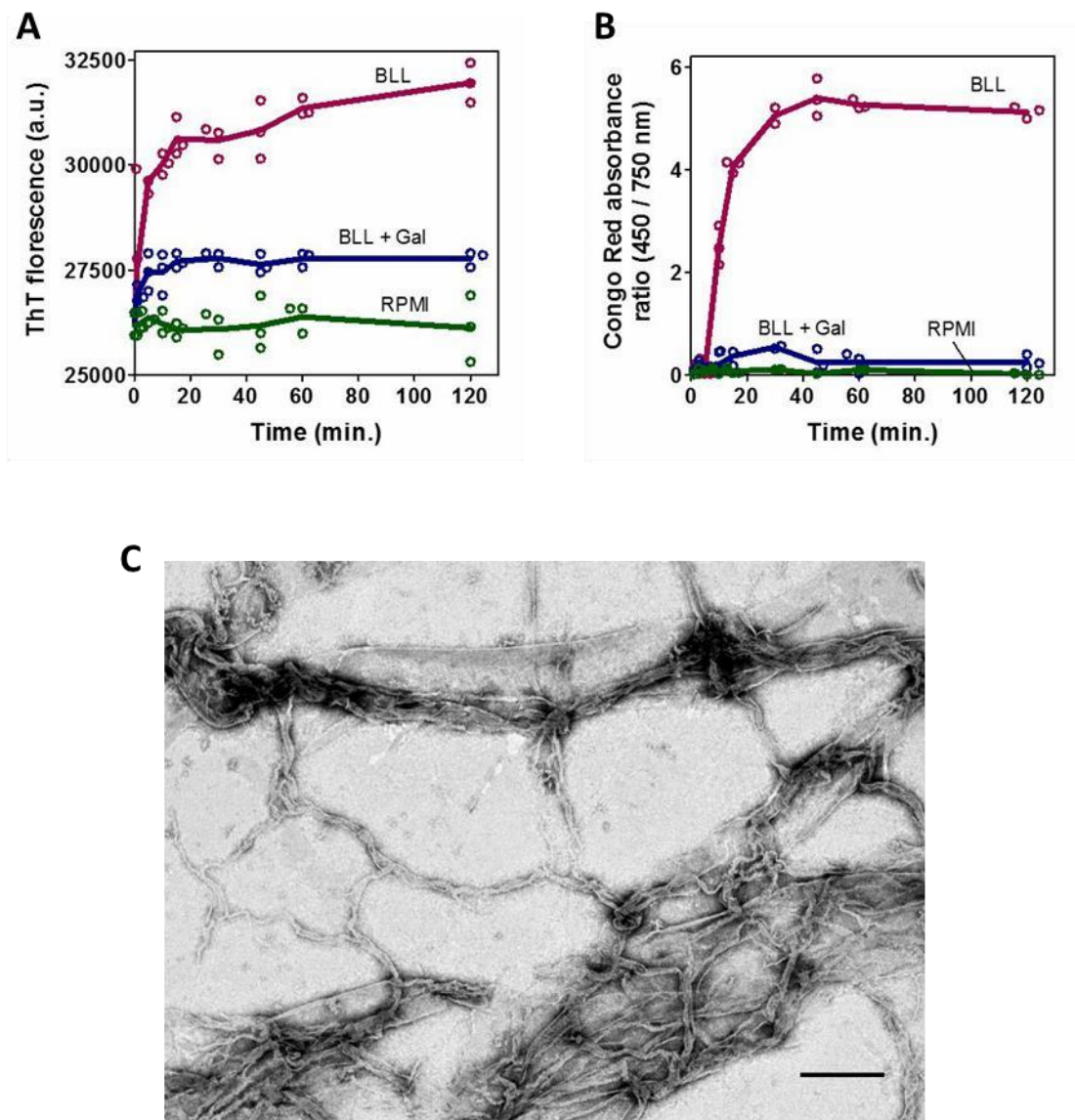


Figure 1. Biochemical and morphological characterization of BLL amyloid-like fibrils. (A) ThT fluorescence and (B) Congo Red absorbance curves of BLL, BLL+Galactose and BLL-free RPMI medium at 37 °C, pH 7.2. Continuous lines represent the mean for each replicate. (C) TEM of negative staining fibril aggregates after 15 min of incubation of BLL in RPMI medium. Bar represents 500nm.

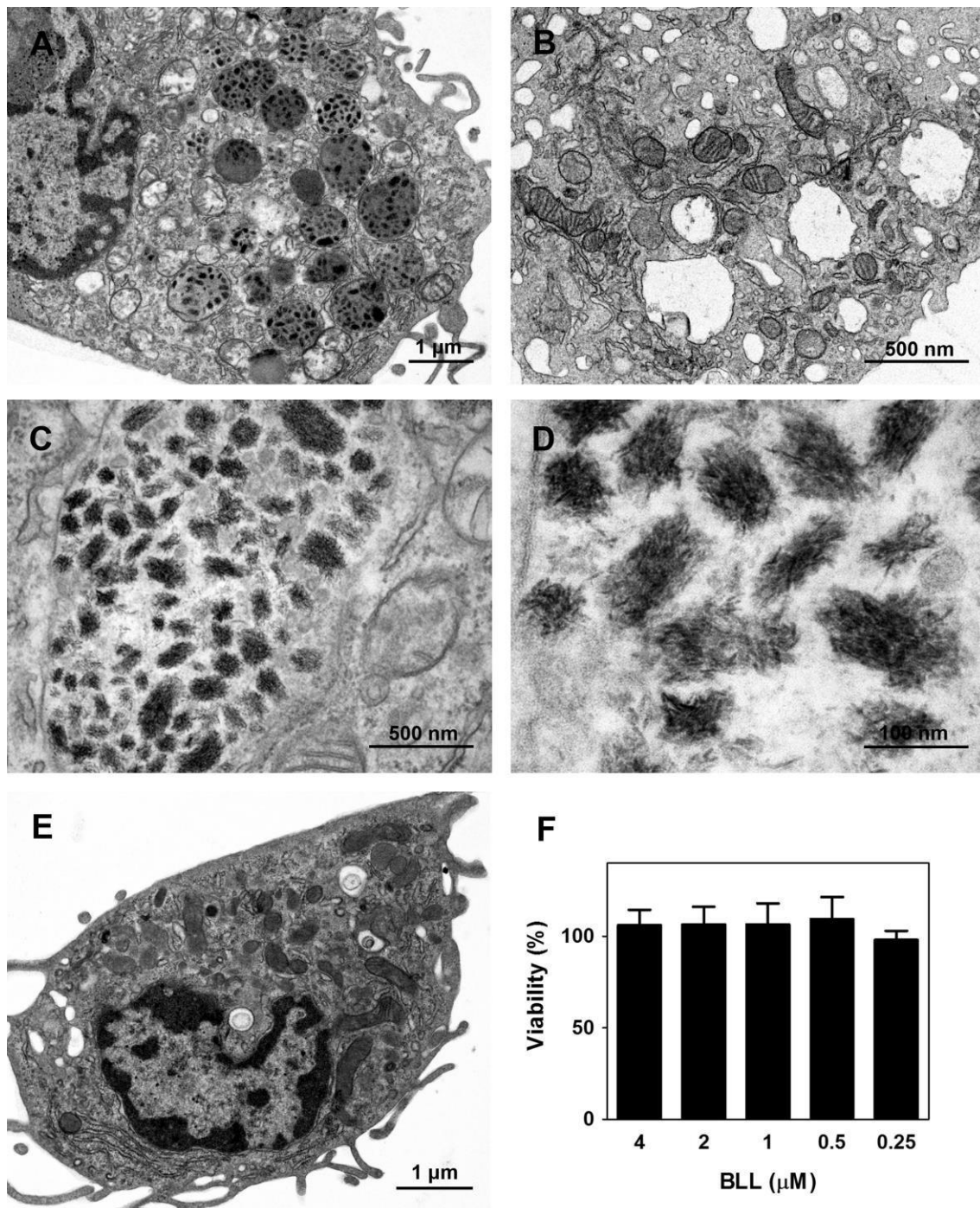


Figure 2. TEM of effect of BLL on macrophage morphology and viability. (A) 1 μM BLL treated-macrophages for 24 h. Note the presence of several vesicles containing fibrillar structures; (B) macrophages treated with BLL plus 200 mM galactose, no fibrillar structures are observed in their vacuoles; (C and D) detail of fibrillar structures inside intracellular compartments of BLL-treated macrophages; (E) control without treatment; and (F) effect of BLL on the macrophage viability, columns represents the percentage of viable cells when compared with cells without treatment. The values are expressed as the means \pm S.D. of three independent experiments.

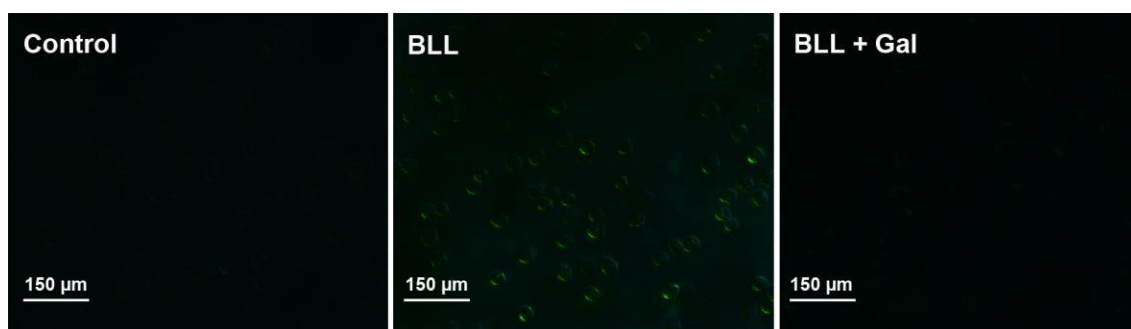


Figure 3. Presence of BLL- amyloid-like fibrils in macrophages. Macrophages were incubated with RPMI medium containing BLL in presence or absence of galactose (200 mM) and submitted to Congo Red staining. A Green birefringence is only observed on the cell surface and in intracellular structures of BLL-treated cells.

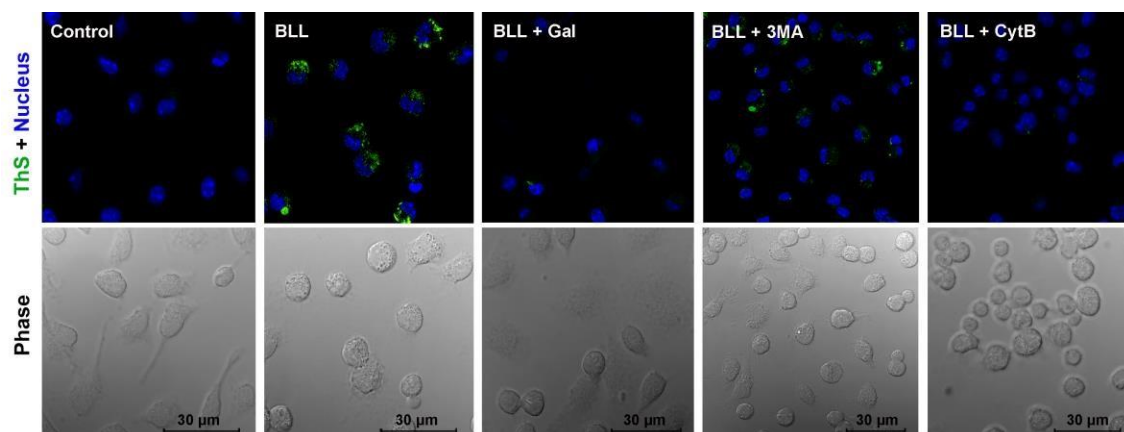


Figure 4. BLL amyloid-like fibrils are internalized by phagocytosis. Macrophages were incubated with RPMI medium containing BLL in presence or absence of galactose, 3- MA or CytB. Thioflavin S (green) and Hoechst 33342 (blue) staining showing localization of intracellular amyloids deposits and nucleus, respectively.

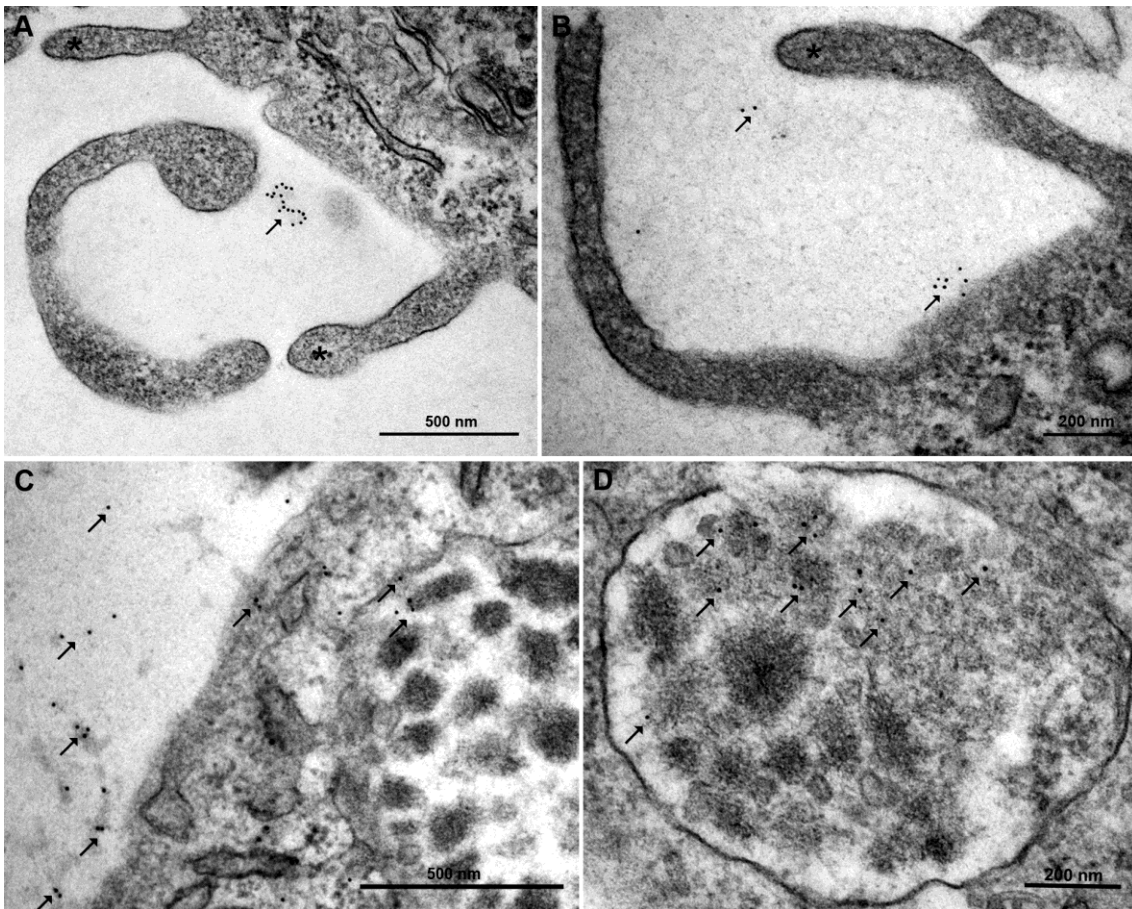


Figure 5. Immunogold-TEM of amyloid-like fibrils in macrophages. Representative electron micrographs of macrophages treated with BLL and immunolabeled with 10 nm gold particle-conjugated and anti-amyloid fibrils LOC antibody. (A-B) Detail of labelling on extracellular fibrillar structure (arrows) and pseudopods (*). Note in (C) the presence of positive labelling on fibrillar structures on the cell surface. (D) High magnification showing the presence of positively labeling fibrils in a large vesicle of macrophage.

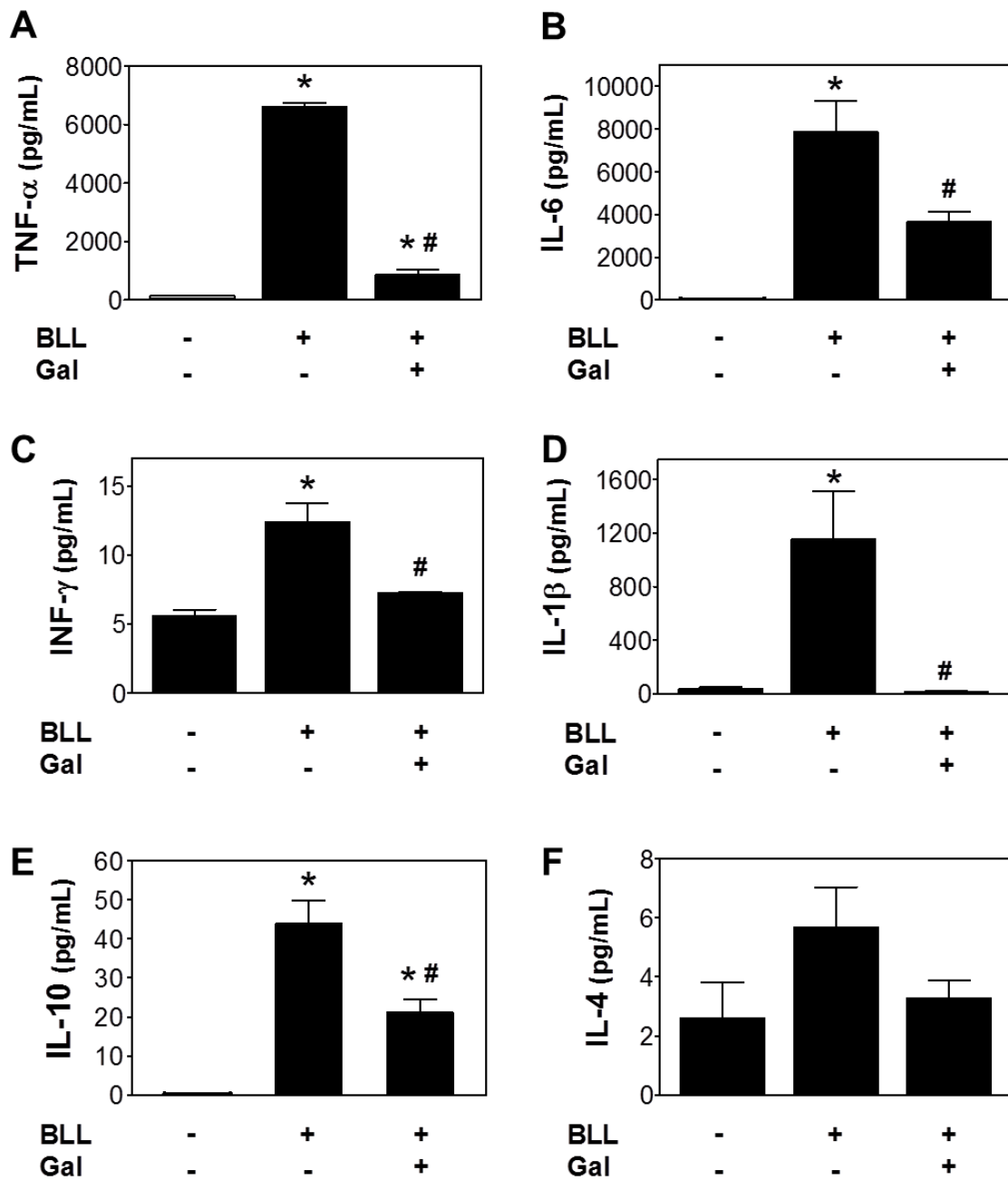


Figure 6. Effects BLL on macrophage pro- and anti-inflammatory cytokine profile. The values are expressed as means \pm S.D. from three independent experiments. (*) Significant differences in relation to control without treatment and (#) significant differences when compared to BLL treated cells.

**APÊNDICE C - PCRAMOLL AND RCRAMOLL LECTINS INDUCE CELL DEATH IN
HUMAN PROSTATE ADENOCARCINOMA (PC-3) CELLS BY IMPAIRMENT OF
MITOCHONDRIAL HOMEOSTASIS**



pCramoll and rCramoll lectins induce cell death in human prostate adenocarcinoma (PC-3) cells by impairment of mitochondrial homeostasis



Evellyne de Oliveira Figueirôa^a, Mary Ângela Aranda-Souza^a, Nathalia Varejão^b, Franco Aparecido Rossato^c, Rute Alves Pereira Costa^c, Tiago Rezende Figueira^c, Luís Cláudio Nascimento da Silva^{d,*}, Roger Frigério Castilho^c, Aníbal Eugênio Vercesi^c, Maria Tereza dos Santos Correia^a

^a Laboratório de Glicoproteínas, Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife (PE), CEP 50670-420, Brazil

^b Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Biologia Estrutural, Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear de Macromoléculas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ) CEP 21941-590, Brazil

^c Laboratório de Bioenergética, Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP) CEP 13083-887, Brazil

^d Programa de Pós graduação em Biologia Parasitária, Universidade CEUMA, São Luís (MA) CEP 65.075-120, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Plant lectin
Cell death
Mitochondrial dysfunction
Cytosolic calcium
Oxidative stress

ABSTRACT

Lectins from *Cratylia mollis* seed have shown potential *in vivo* antitumor actions, however the mechanism have not yet been addressed. Here we evaluated the antitumor effects of native (pCramoll) and recombinant (rCramoll) lectins from *C. mollis* against human prostate adenocarcinoma (PC-3) cells. The viability of PC-3 cells was analyzed with the MTT assay and ANNEXIN V/propidium iodide staining. The actions of pCramoll or rCramoll on mitochondrial superoxide production, free cytosolic calcium concentration and mitochondrial membrane potential were evaluated using fluorescent probes (MitoSox Red, Fura 2-AM and safranin O, respectively). pCramoll and rCramoll reduced the viability of PC-3 cells in a dose-dependent manner. Both lectins increased the generation of mitochondrial superoxide as well as the concentration of cytosolic calcium. These changes led to a decrease in oxidative phosphorylation, which impaired the formation of ATP. The resulting cell death was not blocked by MPT (mitochondrial permeability transition) inhibitors (Debio 025 or bongkrekc acid). Thus pCramoll and rCramoll promote PC-3 cell death through calcium signaling, leading to mitochondrial collapse. This work provides more insights into the action of pCramoll and rCramoll against cancer cells. These lectins represent valuable tools for biomedical research.

1. Introduction

Prostate cancer is a common type of adenocarcinoma that affects the prostate gland and is among the most common adult malignancies worldwide. The high rates of mortality of this cancer are related to metastasis and drug resistance phenomena (Datta et al., 2016; Watson et al., 2015). Prostate cancer metastasizes from the prostate to bone and soft tissues, causing pain and damage, as well as other complications, all of which increase the morbidity and mortality of this disease (Gundem et al., 2015). This scenario makes crucial the search for new compounds for antitumor therapy (Lewinska et al., 2015; Singh et al., 2016), and plant lectins have been suggested as interesting novel anti-cancer drugs (Jiang et al., 2015).

Lectins are a wide class of proteins that are able to recognize and

reversibly bind to carbohydrates, without changing the structure of their ligands. Although more traditionally isolated from plant materials (especially from seeds), these proteins are ubiquitously found and occur in a wide variety of structures and sizes (Coelho et al., 2017; Dias Rde et al., 2015). Plant lectins exhibit a range of therapeutic and biotechnological applications (da Silva and Correia, 2014; Dan et al., 2016). In cancer research, these proteins are important for the development of new anti-tumor agents and diagnostic tools (as they can recognize the different carbohydrate patterns in cancer cells) (Coelho et al., 2017; Faheina-Martins et al., 2012; Jiang et al., 2015; Nascimento da Silva et al., 2014).

The versatility of plant lectins can be exemplified by the lectins derived from *Cratylia mollis*, a native species from the semi-arid region of Brazil (Caatinga biome) (Nascimento da Silva et al., 2014). Four

* Corresponding author.

E-mail addresses: luisclaudionsilva@yahoo.com.br (L.C.N. da Silva), mtscorreia@gmail.com (M.T. dos Santos Correia).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2017.05.016>

Received 9 January 2017; Received in revised form 16 May 2017; Accepted 23 May 2017

Available online 25 May 2017

0887-2333/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

lectin isoforms have been purified from seeds of *C. mollis*, but the preparation composed of isoform 1 and isoform 4 (Cramoll 1,4 or pCramoll) has become the most frequently used for biomedical applications. pCramoll has shown excellent results in different *in vivo* models, for instance as healing (Albuquerque et al., 2017) and anti-tumor agent (Andrade et al., 2004; da Cunha et al., 2016). These results encouraged the production of a recombinant version of Cramoll 1 (rCramoll) in *Escherichia coli* (Varejao et al., 2010). rCramoll shares several physicochemical properties with pCramoll, but it shows more thermodynamic stability in response to acidification, high temperatures or high hydrostatic pressure because of the absence of natural fragmentation in its polypeptide chain (Varejao et al., 2011).

The antitumor activity of both pCramoll and rCramoll when encapsulated in liposomes has been tested against Sarcoma 180 tumor cells grown in Swiss mice, demonstrating that the encapsulation enhances their antitumor activity and decreases tissue toxicity, particularly of the liver and kidneys (Andrade et al., 2004; da Cunha et al., 2016). Our experimental data suggest that immune cells might be associated with this *in vivo* tumor inhibition (da Cunha et al., 2016). As these lectins have been applied only in *in vivo* antitumor studies, there is no evidence for whether they can directly target tumor cells (and induce cell death) or if the *in vivo* action is only the result of their ability to modulate immune cells. The ability of pCramoll to differentiate between normal human prostate cells and prostate carcinoma cells has been reported (de Lima et al., 2010). In addition, both pCramoll and rCramoll are capable of binding the *Trypanosoma cruzi* membrane (Fernandes et al., 2010; Varejao et al., 2010). The cytotoxicity of pCramoll against this protozoan has been related to the induction of the necrotic pathway associated with mitochondrial membrane permeabilization, which allows the entry of Ca^{2+} and its accumulation in mitochondria, increasing the levels of reactive oxygen species (ROS) (Fernandes et al., 2010). In this context, this work aims to investigate the antitumor effects of pCramoll and rCramoll against human prostate adenocarcinoma (PC-3) cells. The role of mitochondrial dysfunction in this effect was also evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Lectin preparations

Seeds of *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean) were collected in the State of Pernambuco (Brazil), and seed extract (10%, w/v; prepared in 0.15 M NaCl) was fractionated using ammonium sulfate (40–60%, w/v). The fraction obtained was submitted to affinity chromatography with Sephadex G-75 (Sigma-Aldrich; St. Louis, USA). The pCramoll preparation was selectively eluted with 0.3 M D-glucose in 0.15 M NaCl, dialyzed against 0.15 M NaCl over a 24-h period and lyophilized (Correia and Coelho, 1995). rCramoll was obtained according to Varejao et al. (2010), by introducing a chemically synthesized DNA encoding the mature Cramoll 1 amino acid sequence into a bacterial expression vector. ConA was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) and used as the experimental control.

2.2. Cell culture

PC-3 cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, USA) and grown in RPMI-1640 (Vitrocell, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin, 100 IU/mL penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin (Vitrocell). The cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 .

2.3. Determination of the effects of lectins on PC-3 cell viability

Cell viability was determined by colorimetric assay using the reagent MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Cells were cultured in 24-

well plates (7000–8000 cells/ cm^2) and exposed to different concentrations (1–300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of ConA, pCramoll or rCramoll for 24 h. After treatment, the medium was aspirated and replaced with RPMI 1640 medium containing MTT (1 mg/mL) in the absence of fetal bovine serum. The cells were incubated for 90 min at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 . Then, sodium dodecyl sulfate was added to each well, until the resulting formazan was completely solubilized. The absorbance was recorded at 570–650 nm with a spectrophotometer (Bio-Rad, USA). A dose-response curve was constructed, and cell viability was expressed as a percentage relative to untreated control cells. This same test was performed to evaluate the viability of cells treated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of lectin as a function of time.

2.4. Analysis of PC-3 cell death by flow cytometry after pCramoll or rCramoll treatment

Cells were cultured in 6-well plates (7000–8000 cells/ cm^2) and exposed to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of pCramoll or rCramoll for 4 h. For the analysis, cells (1×10^6 cells/mL) were harvested and transferred to a cytometer tube and incubated in binding buffer (10 mM HEPES, pH 7.4; 150 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM MgCl_2 ; 1.8 mM CaCl_2) containing annexin V conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) (1:500; Invitrogen, USA) and propidium iodide (PI) (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Molecular Probes, USA). The cytometer tubes were maintained at room temperature for 20 min in the dark. Flow cytometry was performed in a FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences, USA) equipped with an argon laser. Ten thousand events were acquired for each sample, and the results were analyzed using CellQuest software (version 4.1). This assay was also performed to assess the involvement of MPT in the PC-3 cell death induced by lectins in conjunction with the following selective inhibitors: Debio 025 (an analog of cyclosporin A) and bongkreik acid (which binds to the adenine nucleotide translocator, ANT) (Quarato et al., 2012). These inhibitors were added to the cell culture (at 1 μM) ~30 min before the cells were treated with lectins. After 4 h, a cell death analysis was performed similar to that described above. However, this time the cells were labeled only with PI and quantified by flow cytometry.

2.5. Estimation of mitochondrial superoxide levels after pCramoll or rCramoll treatment

Mitochondrial ROS production, mainly superoxide ($\text{O}_2^{\cdot-}$), was measured by flow cytometry using MitoSOX Red (Molecular Probes, USA), a highly selective fluorescent probe for the detection of ROS generated within mitochondria. PC-3 cells were cultured in 6-well plates (7000–8000 cells/ cm^2) and exposed to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of pCramoll or rCramoll for 2 h. After the lectin treatment, the cells (1×10^6 cells/mL) were transferred to a cytometer tube and incubated in RPMI 1640 medium containing 5 μM MitoSox Red at 37 °C in a humidified CO_2 incubator (5%) for 10 min. The cells were then washed with phosphate-buffered saline (PBS). Fluorescence intensity was analyzed using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, USA) with excitation at 488 nm and emission at 620 nm. A minimum of 10,000 events was collected. Results were presented as single-parameter histograms of cellular counts versus fluorescence intensity.

2.6. Spectrofluorimetric measurement of cytosolic Ca^{2+} levels

After the treatment of PC-3 cells with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of pCramoll or rCramoll for 30 min, cells (1×10^6 cells/mL) were washed twice at 1600 rpm for 5 min in PBS containing 11 mM glucose and 0.8 mM MgSO_4 , pH 7.2. Cells were resuspended in PBS (pH 7.2.) containing 11 mM glucose, 0.8 mM MgSO_4 and 5 μM Fura 2-AM (Sigma-Aldrich, USA). The resulting cell suspensions were incubated for 45 min and maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 . Subsequently, the cells were washed with PBS to remove extracellular dye. Cells were resuspended in 1 mL of PBS, and their fluorescence was

measured in a thermostatically regulated (37 °C) F-7000 Hitachi spectrofluorimeter (Hitachi, Japan). Excitation was at 340 nm and 380 nm and emission was at 510 nm. Calibration was performed at the end of each experiment.

2.7. Determination of mitochondrial membrane potential

The mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) was estimated based on safranin O fluorescence in PC-3 cells permeabilized with digitonin. The indicator safranin O binds to energized mitochondrial membranes, which causes changes in its fluorescence amplitude that are proportional to membrane potential values (Figueira et al., 2012). After 30 min of pCramoll treatment (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), PC-3 cells were resuspended in assay medium (125 mM sucrose; 65 mM KCl, pH 7.2; 10 mM HEPES; 2 mM K_2HPO_4 ; 1 mM MgCl_2) containing safranin O (5 μM), EGTA (20 μM) (Sigma-Aldrich, USA), a cocktail of respiratory substrates (α -ketoglutarate, glutamate, malate and pyruvate; 5 mM each) and 20 μM digitonin. To observe cellular respiration and phosphorylation of ATP, 300 μM ADP was added, which was subsequently reversed by the addition of 2.5 μM carboxyatractyloside (CAT). Calcium (20 μM) was added to promote mitochondrial permeability transition. During the experiments the samples were maintained under constant stirring at 37 °C. p-Trifluoromethoxy carbonyl cyanide phenyl hydrazone (1 μM) was used to dissipate the $\Delta\Psi_m$ and allow comparison of the differences in amplitude between $\Delta\Psi_m$ of the control and treated cells. The fluorescence changes were recorded using the F-7000 spectrofluorimeter operating at 495 nm for excitation and 586 nm for emission.

2.8. Statistical analysis

All tests were performed in at least three independent experiments. The concentration needed to kill 50% of cells (EC_{50}) was estimated graphically by non-linear regression analysis. Other data were plotted as the mean values of groups \pm the standard error of the mean (S.E.M.). A statistical analysis was performed using GraphPad Prism 5 software. Data were analyzed with a one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post-test analysis, a two-way ANOVA with Bonferroni's post-test analysis or with Student's *t*-test to analyze differences between two groups. A *p* value of < 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Lectins reduce PC-3 cell viability

The effects of lectins (ConA, pCramoll and rCramoll) on PC-3 cell viability were compared with the MTT assay. Fig. 1A shows a progressive decrease in the viability of PC-3 cells with an increase in pCramoll and rCramoll concentrations. Also, pCramoll and rCramoll had a more robust effect as compared with ConA. All lectins began to significantly reduce the viability of PC-3 cells from a concentration of 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. No significant differences were observed for ConA treatment using concentrations between 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Strikingly, pCramoll and rCramoll began to be highly effective between 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($P < 0.002$). At 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, both pCramoll and rCramoll reduced cell viability to $< 10\%$. Using a non-linear regression graph, it was possible to determine the concentration values able to kill 50% of treated cells (Fig. 1B): the EC_{50} values were 29.91 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 39.69 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for rCramoll and pCramoll, respectively.

These results led us to select the concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to perform additional assays to elucidate the molecular mechanisms involved in pCramoll and rCramoll actions. A time-course kill curve showed that both lectins (at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) significantly decreased PC-3 viability after 2 h of treatment, whereas ConA induced this effect only after 12 h (Fig. 1C). Cell death resulting from pCramoll and rCramoll was already more prevalent than that resulting from ConA after 4 h of incubation ($P < 0.05$).

3.2. Induction of PC-3 cell death by pCramoll and rCramoll is associated to loss of membrane integrity

Next, we evaluated whether the cytotoxic effects of both lectins were accomplished by apoptosis induction using annexin V (AV) and PI as probes. After 4 h lectins treatment at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, a large number of cells exhibited damage in plasmatic membrane (AV^-/PI^+ or AV^+/PI^+), from which the majority were AV^-/PI^+ (46.27 \pm 2.19% and 51.94 \pm 3.19%, for pCramoll or rCramoll incubation, respectively; $P < 0.001$) (Fig. 2). Meanwhile, the number of AV^+/PI^+ cells also significantly increased after incubation with lectins, although the number of apoptotic cells did not increase.

3.3. pCramoll and rCramoll increase both cytosolic calcium and mitochondrial superoxide anion levels in PC-3 cells

To further characterize the mechanisms of action involved in PC-3 cell death caused by pCramoll or rCramoll, we determined the levels of mitochondrial superoxide anions and cytosolic calcium after short periods of incubation. The lectins significantly increased the levels of mitochondrial superoxide (about three-fold; Fig. 3) and cytosolic calcium (about two-fold; Fig. 4) in relation to untreated cells.

3.4. pCramoll and rCramoll effects are related to decrease in oxidative phosphorylation

To assess whether the MPT was involved in the cell death process induced by these lectins, PC-3 cells were exposed to pCramoll or rCramoll for 4 h in the presence of MPT inhibitors. The analysis by flow cytometry demonstrated that the cell death induced by these lectins continued to occur without any significant difference in the presence or absence of MPT inhibitors (Fig. 5).

Finally, we investigated whether the effects of lectins are associated to changes in the oxidative phosphorylation. Since both pCramoll and rCramoll had similar actions, we decided to use only pCramoll in these assays. As shown in Fig. 6, Debio 025 conferred partial protection against the effect of pCramoll on mitochondrial membrane potential, as this MPT inhibitor conferred a higher capacity for retention of the mitochondrial membrane potential after addition of 20 μM of calcium ions. This leads us to conclude that cells treated with pCramoll died, probably because they have a reduced oxidative phosphorylation, culminating in an ATP deficiency. This suggests that there was a small contribution of MPT to this effect, but the presence of the inhibitor was not sufficient to protect against cell death.

4. Discussion

In this study, we analyzed the induction of cell death in PC-3 cells exposed to pCramoll and rCramoll and the role of mitochondrial dysfunction in this effect. pCramoll and rCramoll function as antitumor agents *in vivo* (Andrade et al., 2004; da Cunha et al., 2016). A histochemical evaluation using formalin-fixed tissue blocks revealed that pCramoll is a potential probe for cancer diagnosis as it was able to bind specifically to prostate carcinoma cells and their extracellular structure (corpora amylacea) (de Lima et al., 2010). These findings led to the development of a label-free pCramoll nanoelectrode able to distinguish benign and malignant prostatic hyperplasia (Silva et al., 2016). This specific binding of Cramoll (and other lectins) to cancer cells is attributed to the aberrant glycosylation pattern that these cells exhibit (Kirwan et al., 2015).

Both rCramoll and pCramoll reduced PC3 viability with EC_{50} values of 29.91 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 39.69 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Previous studies using similar concentrations showed that neither pCramoll nor rCramoll had cytotoxic effects on normal mammalian cells such as human lymphocytes (concentrations ranging from 0.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Maciel et al., 2004), mice lymphocytes (concentrations ranging from 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$

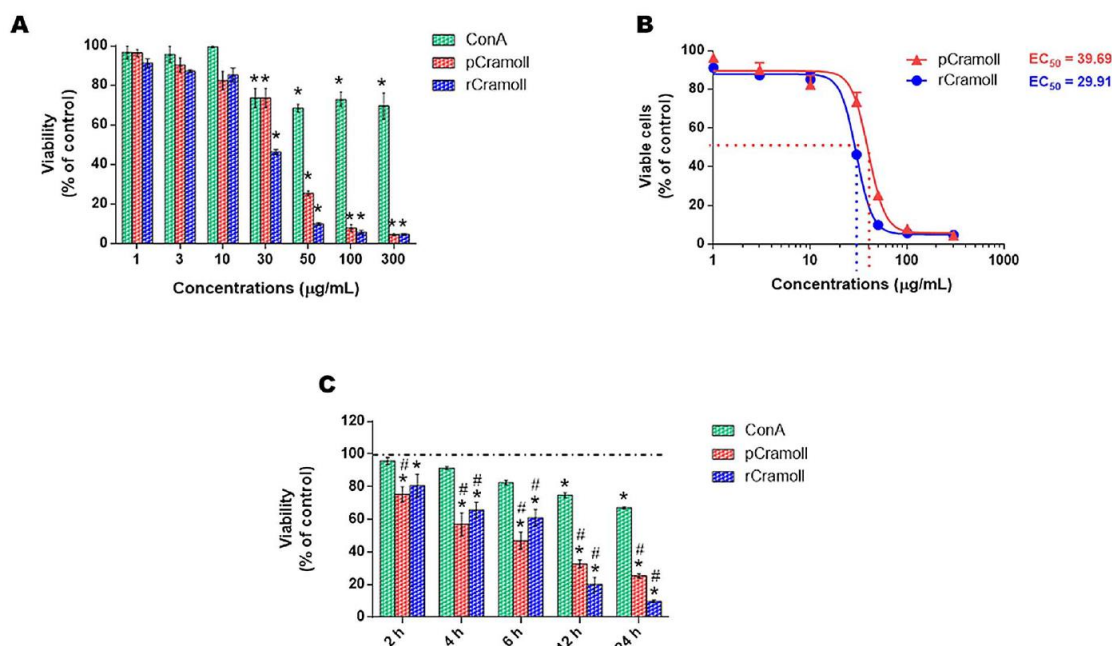


Fig. 1. Effects of lectins on PC-3 cell viability. **A:** ConA, pCramoll and rCramoll reduce PC-3 cell viability. Cells were treated with varying concentrations of ConA, pCramoll or rCramoll for 24 h. **B:** Dose-response curve of PC-3 cells after 24 h of treatment with varying concentrations of pCramoll or rCramoll lectins. **C:** pCramoll and rCramoll decrease cell viability according to the treatment time. PC-3 cells were treated with ConA, pCramoll or rCramoll lectins (50 µg/mL). The cell viability was determined using MTT (1 mg/mL). Values are the mean \pm S.E.M. from at least three independent experiments. * $P < 0.05$: Significantly different from untreated cells; # $P < 0.05$: pCramoll or rCramoll versus ConA at each respective time point.

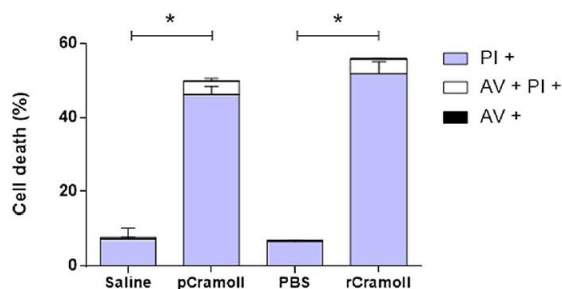


Fig. 2. pCramoll and rCramoll induce death in PC-3 cells in associated to loss of membrane integrity. PC-3 human prostate tumor cells were treated with 50 µg/mL of pCramoll or rCramoll for 4 h. The cells were submitted to Annexin V-FITC and PI staining and analyzed using flow cytometry. *Significantly different from untreated cells at $P < 0.0001$, two-way ANOVA with Bonferroni's post-test analysis.

to 25 µg/mL (de Melo et al., 2010a; de Melo et al., 2010b) and mice peritoneal exudate cells (concentrations ranging from 1.56 µg/mL to 25 µg/mL) (da Silva et al., 2015b). In addition, these lectins induce cell proliferation even when the targeted cells (Vero monkey kidney fibroblast line) are exposed to oxidative stress (da Silva et al., 2015a).

In the present study, pCramoll and rCramoll induced cell death in PC-3 cells with higher cytotoxicity than ConA. Cramoll and ConA have 82% sequence identity, the same sugar affinity and essentially the same quaternary structure (De Souza et al., 2003; Nascimento da Silva et al., 2014). Despite their similarities, different patterns of biological activities have been already evidenced by other authors (de Oliveira et al., 2013). This current paper also shows that both pCramoll and rCramoll induced stronger effects than ConA on cell viability. Our results corroborate with a previous work where ConA at 100 µg/mL (higher tested concentration) showed weak action towards PC3 cells after 48 h incubation in medium containing 10% (inhibition of 30%) or 1%

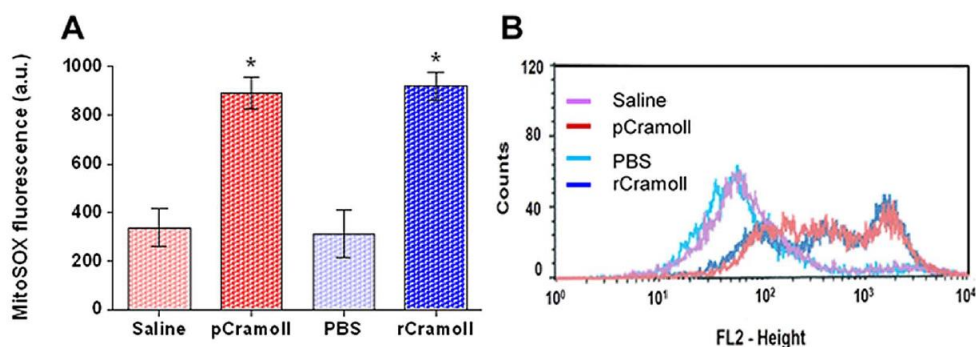


Fig. 3. pCramoll and rCramoll increase mitochondrial superoxide levels in PC-3 cells. Following 2 h of treatment with pCramoll or rCramoll, cells were incubated with 5 µM MitoSOX at 37 °C for 10 min. Superoxide levels were then analyzed by flow cytometry. **A:** Relative extent of increase in mitochondrial superoxide. **B:** Representative traces from flow cytometry analysis. Values are the mean \pm S.E.M. from four independent experiments. *Significantly different from untreated cells at $P < 0.01$, one-way ANOVA with Tukey's post-test analysis. a.u., arbitrary units.

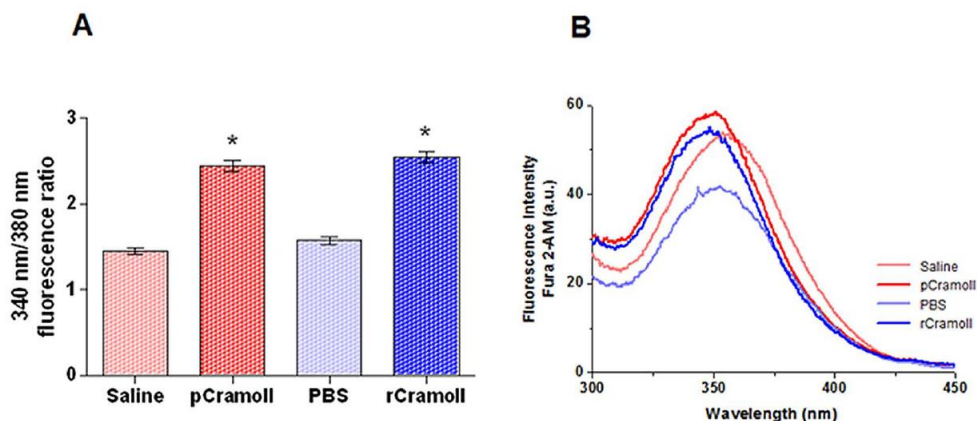


Fig. 4. Treatment with pCramoll or rCramoll increases intracellular calcium levels in PC-3 human prostate tumor cells. **A**: PC-3 cells were treated with pCramoll or rCramoll (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 30 min and then probed with 5 μM Fura 2-AM to measure cytosolic Ca^{2+} levels, as indicated by the 340 nm/380 nm fluorescence ratio. Representative traces from one of seven independent experiments. Values are the mean \pm S.E.M. *Significantly different from control at $P < 0.0001$, one-way ANOVA with Tukey's post-test analysis. a.u., arbitrary units.

(inhibition of 40%) of fetal bovine serum (FBS). The authors provide insights that FBS could antagonize the action of ConA, this effect on PC3 viability was more evident in longer periods of incubation (> 48 h) (Camby et al., 1996).

The anti-proliferative effects of ConA have been established for some cancer cell lineages (such as human melanoma A375 cells and human breast carcinoma MCF-7 cells) using low doses of this lectin. In addition, the molecular mechanisms related to ConA action involve mitochondria-dependent apoptotic and autophagic pathways (Li et al., 2011; Liu et al., 2009; Shi et al., 2014). However, our results showed that pCramoll and rCramoll treatment did not result in induction of apoptosis in PC-3 cells.

Mitochondrial dysfunction is a common cause of cell death and leads to the collapse of energy metabolism (reduced ATP levels) and an increase in cytosolic Ca^{2+} . Excessive amounts of cytosolic Ca^{2+} may activate catabolic enzymes, phospholipases, endonucleases and proteases (such as cathepsins and/or calpains) (Orrenius et al., 2015). The exposure of PC-3 cells to pCramoll and rCramoll enhanced mitochondrial superoxide generation and increased cytosolic calcium levels, which were accompanied by loss of $\Delta\Psi\text{m}$. Mitochondrial calcium homeostasis has important roles in various cellular processes, including

cell death (Giacomello et al., 2007; Giorgi et al., 2008). Alterations in mitochondrial metabolism have been related to the action of pCramoll against *T. cruzi* (Fernandes et al., 2010; Fernandes et al., 2014). This lectin is able to interact with glycoproteins present on the membrane of this trypanosome during the epimastigote stage of its development, leading to its internalization and binding to the parasite mitochondrion. This results in mitochondrial Ca^{2+} overload, enhanced ROS production, decreased $\Delta\Psi\text{m}$ and impaired ADP phosphorylation (Fernandes et al., 2010; Fernandes et al., 2014). Cancer cells also have several surface molecules integrated with the cytoskeleton, and thus lectins could bind these structures to induce destabilization of the membrane and consequently cell death, as shown for other compounds (Klimaszewska-Wisniewska et al., 2017; Noel et al., 2016; Pawlik et al., 2016).

The necrosis induced by pCramoll in *T. cruzi* epimastigotes is mediated by a MPT-like mechanism (Fernandes et al., 2014). In this sense, we evaluated the involvement of MPT in the anti-proliferative action of pCramoll and rCramoll using the MPT inhibitors Debio 025 and bongkreic acid. Debio 025 is an analog of the immunosuppressant cyclosporin A. Submicromolar concentrations of cyclosporin A are capable of inhibiting MPT (Broekemeier et al., 1989; Crompton et al.,

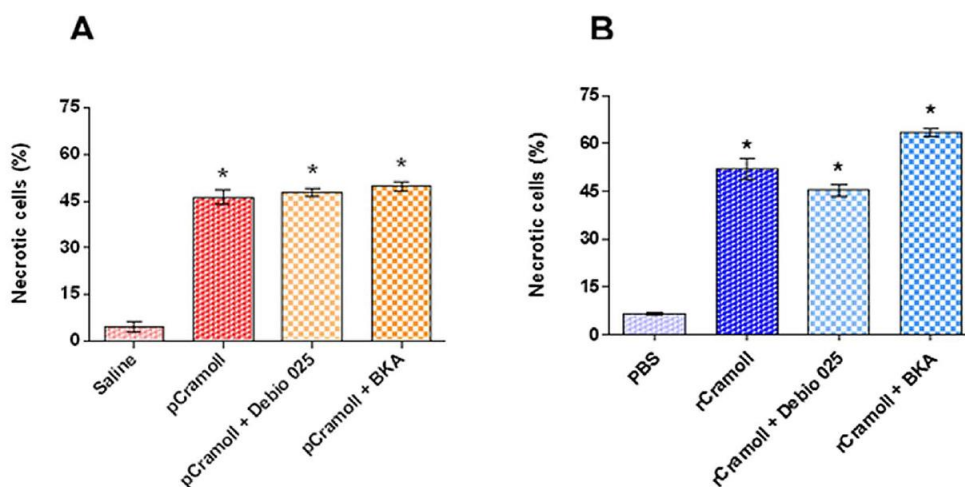


Fig. 5. Cell death in PC-3 human prostate tumor cells induced by pCramoll or rCramoll is not inhibited by treatment with the MPT inhibitors Debio 025 and bongkreic acid. **A**, **B**: PC-3 cells were treated with pCramoll (**A**) or rCramoll (**B**) for 4 h in the presence or absence of 1 μM Debio 025 or 1 μM bongkreic acid (BKA). Cell death was assessed by flow cytometry analysis using PI staining. The values are expressed as the mean \pm S.E.M. from four independent experiments for each condition. * $P < 0.01$ versus control cells, one-way ANOVA with Tukey's post-test analysis.

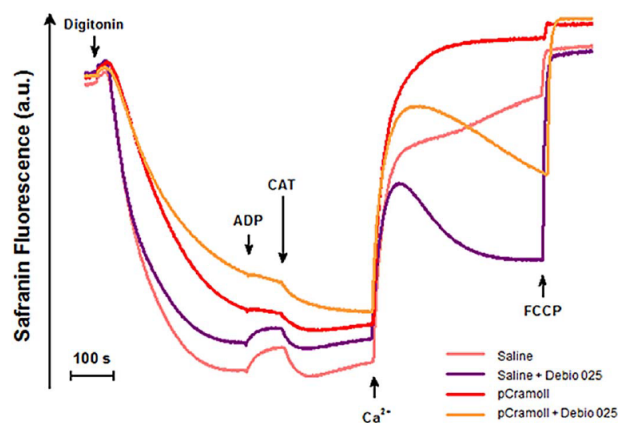


Fig. 6. PC-3 cell death induced by pCramoll is associated to a large decrease in oxidative phosphorylation. PC-3 cells were treated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pCramoll for 30 min, and then $\sim 1 \times 10^6$ viable cells/mL were permeabilized with 20 μM digitonin. $\Delta\Psi\text{m}$ was estimated by safranin fluorescence. The arrows indicate the addition of 20 μM digitonin, 300 μM ADP, 2.5 μM carboxyatractyloside (CAT), 20 μM calcium ions and 1 μM FCCP. Representative traces are shown from one of three independent experiments. a.u., arbitrary units.

1988), probably through its binding to cyclophilins at the inner mitochondrial membrane (Connern and Halestrap, 1994; Nicolli et al., 1996). Bongkreic acid inhibits the MPT pore opening by binding to the adenine nucleotide translocase channel (Halestrap et al., 2002). The MPT depends on the presence of Ca^{2+} in the intramitochondrial space and membrane proteins such as cyclophilins, which change their conformation to facilitate the opening of the MPT pore (Figueira et al., 2013; Lee et al., 2014).

MPT can be stimulated by a series of compounds known as inducers, and recently our group reported that the lectin isolated from *Bothrops leucurus* snake venom (BIL) is able to cause necrosis in B16-F10 cells with the involvement of mitochondria via Ca^{2+} overload and MPT pore opening (Aranda-Souza et al., 2014). In this present study, neither of the MPT inhibitors (Debio 025 or bongkreic acid) were able to protect the cells against death caused pCramoll. However, it was noted that PC-3 cells exposed to Debio 025 and, subsequently, treated with pCramoll had a higher retention capacity of membrane potential after the addition of Ca^{2+} , suggesting that Debio 025 confers partial protection to these cells, although not sufficient protection to keep them alive. The permeabilization followed by an influx of Ca^{2+} and calcium overload within the mitochondria favors the generation of ROS (Irigoin et al., 2009). This calcium overload is also able to change the organization of the mitochondrial membrane, which affects the respiratory chain and leads to oxidative damage, resulting in cell death (Figueira et al., 2013; Grijalba et al., 1999).

Taken together, the results from this work indicate that pCramoll and rCramoll are able to quickly cause the death of PC-3 cells which is associated to impairment of membrane integrity and mitochondrial homeostasis. Cell death is triggered by increase in cytosolic calcium levels and release of mitochondrial superoxide, resulting in reduced oxidative phosphorylation and lower rate of energy production.

Conflict of interest

No conflicts to declare.

Author contributions

EOF, AEV and MTSC conceived the study and participated in its design and coordination. EOF and NV performed the purification of rCramoll and pCramoll. EOF, MAAS, FAR, RAPC and TRF performed the cell assays. EOF, LCNS, RFC, AEV and MTSC analyzed the data and

drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Transparency document

The <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2017.05.016> associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgements

The authors are grateful for financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do estado de Pernambuco (FACEPE, AMD-0156-2.00/12), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP grants #2011/50400-0 and #2011/51800-1).

References

- Albuquerque, P.B.S., Soares, P.A.G., Aragao-Neto, A.C., Albuquerque, G.S., Silva, L.C.N., Lima-Ribeiro, M.H.M., Silva Neto, J.C., Coelho, L., Correia, M.T.S., Teixeira, J.A.C., Carneiro-da-Cunha, M.G., 2017. Healing activity evaluation of the galactomannan film obtained from *Cassia grandis* seeds with immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. *Int. J. Biol. Macromol.* 102, 9.
- Andrade, C.A., Correia, M.T., Coelho, L.C., Nascimento, S.C., Santos-Magalhaes, N.S., 2004. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. *Int. J. Pharm.* 278, 435–445.
- Aranda-Souza, M.A., Rossato, F.A., Costa, R.A., Figueira, T.R., Castilho, R.F., Guarniere, M.C., Nunes, E.S., Coelho, L.C., Correia, M.T., Vercesi, A.E., 2014. A lectin from *Bothrops leucurus* snake venom raises cytosolic calcium levels and promotes B16-F10 melanoma necrotic cell death via mitochondrial permeability transition. *Toxicol.* 82, 97–103.
- Broekemeier, K.M., Dempsey, M.E., Pfeiffer, D.R., 1989. Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 264, 7826–7830.
- Camby, I., Janssen, T., Decker, R.D., Petein, M., Raviv, G., Pasteels, J.-L., Kiss, R., Danguy, A., 1996. Lectin-induced alterations on the proliferation of three human prostatic cancer cell lines. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 32, 7.
- Coelho, L.C., Silva, P.M., Lima, V.L., Pontual, E.V., Paiva, P.M., Napoleao, T.H., Correia, M.T., 2017. Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/pharmacological and therapeutic applications. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2017, 1594074.
- Connern, C.P., Halestrap, A.P., 1994. Recruitment of mitochondrial cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of a calcium-sensitive non-specific channel. *Biochem. J.* 302 (Pt 2), 321–324.
- Correia, M.T., Coelho, L.C., 1995. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). *Appl. Biochem. Biotechnol.* 55, 261–273.
- Crompton, M., Ellinger, H., Costi, A., 1988. Inhibition by cyclosporin A of a Ca^{2+} -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem. J.* 255, 357–360.
- da Cunha, C.R., da Silva, L.C., Almeida, F.J., Ferraz, M.S., Varejao, N., Cartaxo, M.F., de Miranda, R.C., de Aguiar Jr., F.C., Santos, N.P., Coelho, L.C., Santos-Magalhaes, N.S., Correia, M.T., 2016. Encapsulation into stealth liposomes enhances the antitumor action of recombinant *Cratylia mollis* lectin expressed in *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 7, 1355.
- Dan, X., Liu, W., Ng, T.B., 2016. Development and applications of lectins as biological tools in biomedical research. *Med. Res. Rev.* 36, 221–247.
- Datta, D., Aftabuddin, M., Gupta, D.K., Raha, S., Sen, P., 2016. Human prostate cancer hallmarks map. *Sci. Rep.* 6, 30691.
- De Souza, G.A., Oliveira, P.S., Trapani, S., Santos, A.C., Rosa, J.C., Laure, H.J., Faca, V.M., Correia, M.T., Tavares, G.A., Oliva, G., Coelho, L.C., Greene, L.J., 2003. Amino acid sequence and tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin. *Glycobiology* 13, 961–972.
- Dias, R.O., Machado, L.S., Migliolo, L., Franco, O.L., 2015. Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. *Molecules* 20, 519–541.
- Faheina-Martins, G.V., Silveira, A.L., Cavalcanti, B.C., Ramos, M.V., Moraes, M.O., Pessoa, C., Araujo, D.A., 2012. Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. *Toxicol. in Vitro* 26, 1161–1169.
- Fernandes, M.P., Inada, N.M., Chiaratti, M.R., Araujo, F.F., Meirelles, F.V., Correia, M.T., Coelho, L.C., Alves, M.J., Gadelha, F.R., Vercesi, A.E., 2010. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin. *J. Bioenerg. Biomembr.* 42, 69–78.
- Fernandes, M.P., Leite, A.C., Araujo, F.F., Saad, S.T., Baratti, M.O., Correia, M.T., Coelho, L.C., Gadelha, F.R., Vercesi, A.E., 2014. The *Cratylia mollis* seed lectin induces membrane permeability transition in isolated rat liver mitochondria and a cyclosporine A-insensitive permeability transition in *Trypanosoma cruzi* mitochondria. *J. Eukaryot. Microbiol.* 61, 381–388.

- Figueira, T.R., Melo, D.R., Vercesi, A.E., Castilho, R.F., 2012. Safranin as a fluorescent probe for the evaluation of mitochondrial membrane potential in isolated organelles and permeabilized cells. *Methods Mol. Biol.* 810, 103–117.
- Figueira, T.R., Barros, M.H., Camargo, A.A., Castilho, R.F., Ferreira, J.C., Kowaltowski, A.J., Sluse, F.E., Souza-Pinto, N.C., Vercesi, A.E., 2013. Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 2029–2074.
- Giacomello, M., Drago, I., Pizzo, P., Pozzan, T., 2007. Mitochondrial Ca²⁺ as a key regulator of cell life and death. *Cell Death Differ.* 14, 1267–1274.
- Giorgi, C., Romagnoli, A., Pinton, P., Rizzuto, R., 2008. Ca²⁺ signaling, mitochondria and cell death. *Curr. Mol. Med.* 8, 119–130.
- Grijalba, M.T., Vercesi, A.E., Schreier, S., 1999. Ca²⁺-induced increased lipid packing and domain formation in submitochondrial particles. A possible early step in the mechanism of Ca²⁺-stimulated generation of reactive oxygen species by the respiratory chain. *Biochemistry* 38, 13279–13287.
- Gundem, G., Van Loo, P., Kremeyer, B., Alexandrov, L.B., Tubio, J.M., Papaemmanuil, E., Brewer, D.S., Kallio, H.M., Hognas, G., Annala, M., Kivinummi, K., Goody, V., Latimer, C., O'Meara, S., Dawson, K.J., Isaacs, W., Emmert-Buck, M.R., Nykter, M., Foster, C., Kote-Jarai, Z., Easton, D., Whitaker, H.C., Group, I.P.U., Neal, D.E., Cooper, C.S., Eeles, R.A., Visakorpi, T., Campbell, P.J., McDermott, U., Wedge, D.C., Bova, G.S., 2015. The evolutionary history of lethal metastatic prostate cancer. *Nature* 520, 353–357.
- Halestrap, A.P., McStay, G.P., Clarke, S.J., 2002. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* 84, 153–166.
- Irgoin, F., Inada, N.M., Fernandes, M.P., Piacenza, L., Gadelha, F.R., Vercesi, A.E., Radi, R., 2009. Mitochondrial calcium overload triggers complement-dependent superoxide-mediated programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* 418, 595–604.
- Jiang, Q.L., Zhang, S., Tian, M., Zhang, S.Y., Xie, T., Chen, D.Y., Chen, Y.J., He, J., Liu, J., Ouyang, L., Jiang, X., 2015. Plant lectins, from ancient sugar-binding proteins to emerging anti-cancer drugs in apoptosis and autophagy. *Cell Prolif.* 48, 17–28.
- Kirwan, A., Utratna, M., O'Dwyer, M.E., Joshi, L., Kilcoyne, M., 2015. Glycosylation-based serum biomarkers for cancer diagnostics and prognostics. *Biomed. Res. Int.* 2015, 490531.
- Klimaszewska-Wisniewska, A., Halas-Wisniewska, M., Izdebska, M., Gagat, M., Grzanka, A., Grzanka, D., 2017. Antiproliferative and antimetastatic action of quercetin on A549 non-small cell lung cancer cells through its effect on the cytoskeleton. *Acta Histochem.* 119, 99–112.
- Lee, G.H., Lee, H.Y., Li, B., Kim, H.R., Chae, H.J., 2014. Bax inhibitor-1-mediated inhibition of mitochondrial Ca²⁺ intake regulates mitochondrial permeability transition pore opening and cell death. *Sci. Rep.* 4, 5194.
- Lewinska, A., Siwak, J., Rzeszutek, I., Wnuk, M., 2015. Diosmin induces genotoxicity and apoptosis in DU145 prostate cancer cell line. *Toxicol. in Vitro* 29, 417–425.
- Li, W.W., Yu, J.Y., Xu, H.L., Bao, J.K., 2011. Concanavalin A: a potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414, 282–286.
- de Lima, A.L., Cavalcanti, C.C., Silva, M.C., Paiva, P.M., Coelho, L.C., Beltrao, E.I., dos, S.C.M.T., 2010. Histochemical evaluation of human prostatic tissues with *Cratylia mollis* seed lectin. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 179817.
- Liu, B., Min, M.W., Bao, J.K., 2009. Induction of apoptosis by Concanavalin A and its molecular mechanisms in cancer cells. *Autophagy* 5, 432–433.
- Maciel, E.V., Araujo-Filho, V.S., Nakazawa, M., Gomes, Y.M., Coelho, L.C., Correia, M.T., 2004. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals* 32, 57–60.
- de Melo, C.M., de Castro, M.C., de Oliveira, A.P., Gomes, F.O., Pereira, V.R., Correia, M.T., Coelho, L.C., Paiva, P.M., 2010a. Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. *Phytother. Res.* 24, 1631–1636.
- de Melo, C.M., Paim, B.A., Zecchin, K.G., Morari, J., Chiaratti, M.R., Correia, M.T., Barroso Coelho, L.C., Paiva, P.M., 2010b. Cramoll 1,4 lectin increases ROS production, calcium levels, and cytokine expression in treated spleen cells of rats. *Mol. Cell. Biochem.* 342, 163–169.
- Nascimento da Silva, L.C., Bezerra Filho, C.M., Paula, R.A., Coelho, L.C.B.B., Vanusa da Silva, M., Correia, M.T.S., 2014. *Cratylia mollis* lectin: a versatile tool for biomedical studies. *Curr. Bioact. Compd.* 10, 11.
- Nicolli, A., Basso, E., Petronilli, V., Wenger, R.M., Bernardi, P., 1996. Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, and cyclosporin A-sensitive channel. *J. Biol. Chem.* 271, 2185–2192.
- Noel, C., Simard, J.C., Girard, D., 2016. Gold nanoparticles induce apoptosis, endoplasmic reticulum stress events and cleavage of cytoskeletal proteins in human neutrophils. *Toxicol. in Vitro* 31, 12–22.
- de Oliveira, P.S., Rego, M.J., da Silva, R.R., Cavalcanti, M.B., Galdino, S.L., Correia, M.T., Coelho, L.C., Pitta, M.G., 2013. *Cratylia mollis* 1, 4 lectin: a new biotechnological tool in IL-6, IL-17A, IL-22, and IL-23 induction and generation of immunological memory. *Biomed. Res. Int.* 2013, 263968.
- Orrenius, S., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., 2015. Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 460, 72–81.
- Pawlik, A., Szczepanski, M.A., Klimaszewska-Wisniewska, A., Gackowska, L., Zuryn, A., Grzanka, A., 2016. Cytoskeletal reorganization and cell death in mitoxantrone-treated lung cancer cells. *Acta Histochem.* 118, 784–796.
- Quarato, G., D'Aprile, A., Gavillet, B., Vuagniaux, G., Moradpour, D., Capitanio, N., Piccoli, C., 2012. The cyclophilin inhibitor alisporivir prevents hepatitis C virus-mediated mitochondrial dysfunction. *Hepatology* 55, 1333–1343.
- Shi, Z., Chen, J., Li, C.Y., An, N., Wang, Z.J., Yang, S.L., Huang, K.F., Bao, J.K., 2014. Antitumor effects of concanavalin A and *Sophora flavescens* lectin in vitro and in vivo. *Acta Pharmacol. Sin.* 35, 248–256.
- da Silva, L.C., Correia, M.T., 2014. Plant lectins and toll-like receptors: implications for therapy of microbial infections. *Front. Microbiol.* 5, 20.
- da Silva, L.C., Alves, N.M., de Castro, M.C., Higinio, T.M., da Cunha, C.R., Pereira, V.R., da Paz, N.V., Coelho, L.C., Correia, M.T., de Figueiredo, R.C., 2015a. pCramoll and rCramoll as new preventive agents against the oxidative dysfunction induced by hydrogen peroxide. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2015, 520872.
- da Silva, L.C., Alves, N.M., de Castro, M.C., Pereira, V.R., da Paz, N.V., Coelho, L.C., de Figueiredo, R.C., Correia, M.T., 2015b. Immunomodulatory effects of pCramoll and rCramoll on peritoneal exudate cells (PECs) infected and non-infected with *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Biol. Macromol.* 72, 848–854.
- Silva, P.M., Lima, A.L., Silva, B.V., Coelho, L.C., Dutra, R.F., Correia, M.T., 2016. *Cratylia mollis* lectin nanoelectrode for differential diagnostic of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia based on label-free detection. *Biosens. Bioelectron.* 85, 171–177.
- Singh, S., Sharma, B., Kanwar, S.S., Kumar, A., 2016. Lead phytochemicals for anticancer drug development. *Front. Plant Sci.* 7, 1667.
- Varejao, N., Almeida Mda, S., De Cicco, N.N., Atella, G.C., Coelho, L.C., Correia, M.A., Foguel, D., 2010. Heterologous expression and purification of a biologically active legume lectin from *Cratylia mollis* seeds (CRAMOLL 1). *Biochim. Biophys. Acta* 1804, 1917–1924.
- Varejao, N., Correia, M.T., Foguel, D., 2011. Characterization of the unfolding process of the tetrameric and dimeric forms of *Cratylia mollis* seed lectin (CRAMOLL 1): effects of natural fragmentation on protein stability. *Biochemistry* 50, 7330–7340.
- Watson, P.A., Arora, V.K., Sawyers, C.L., 2015. Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. *Nat. Rev. Cancer* 15, 701–711.

APÊNDICE D - LECTIN-CARBOHYDRATE INTERACTIONS: IMPLICATIONS FOR THE DEVELOPMENT OF NEW ANTICANCER AGENTS

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae

Current Medicinal Chemistry, 2017, 24, 1-14

1

REVIEW ARTICLE

Lectin-Carbohydrate Interactions: Implications for the Development of New Anticancer Agents

Evellyne de Oliveira Figueirôa^a, Cassia Regina Albuquerque da Cunha^a, Priscilla B.S. Albuquerque^a, Raiana Apolinário de Paula^a, Mary Ângela Aranda-Souza^a, Matheus Alves da Silva^b, Adrielle Zagnignan^b, Maria G. Carneiro-da-Cunha^a, Luís Cláudio Nascimento da Silva^{b,§} and Maria Tereza dos Santos Correia^{a,§*}

^aDepartamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, CEP 50670-420, Recife, PE, Brazil; ^bPós-graduação em Biologia Parasitária, Universidade Ceuma, CEP 65075-120, São Luís, MA, Brazil

Abstract: Lectins are a large group of proteins found in animals, plants, fungi, and bacteria that recognize specific carbohydrate targets and play an important role in cell recognition and communication, host-pathogen interactions, embryogenesis, and tissue development. Recently, lectins have emerged as important biomedical tools that have been used in the development of immunomodulatory, antipathogenic, and anticancer agents. Several lectins have been shown to have the ability to discriminate between normal cells and tumor cells as a result of their different glycosylation patterns. Furthermore, the specific binding of lectins to cancer cells has been shown to trigger mechanisms that can promote the death of these abnormal cells. Here, we review the importance of lectins-carbohydrates interactions in cancer therapy and diagnosis. We examine the use of lectins in the modification of nanoparticles (liposomes, solid lipid nanoparticles and other polymers) for anticancer drug delivery. The development of drug delivery systems (liposomes, alginate/chitosan microcapsules, alginate beads) carrying some antitumor lectins is also discussed. In these cases, the processes of cell death induced by these antitumor lectins were also showed (if available). In both cases (lectin-conjugated polymers or encapsulated lectins), these new pharmaceutical preparations showed improved intracellular delivery, bioavailability and targetability leading to enhanced therapeutic index and significantly less side effects.

ARTICLE HISTORY

Received: February 13, 2017

Revised: April 12, 2017

Accepted: May 13, 2017

DOI:

10.2174/0929867324666170523110400

Keywords: Lectins, Glycosylation, Cancer diagnosis and therapy, Tumor cells, Cell death, Liposomes.

1. INTRODUCTION

Our current definition of lectins was proposed in the mid-1990s, when Peumans and Van Damme characterized them as non-immune proteins that contain a non-catalytic site for the specific and reversible recognition of saccharides that does not change the covalent bonding structure of their glycosidic linkages [1]. These proteins can be classified based on their molecular structure and number of sugar binding domains in

merolectins, hololectins, chimerolectins, and superlectins (Fig. 1). The aspects of lectin discovery and the development of the field “lectinology” have been recently revised by Manning *et al.* [2].

These proteins are ubiquitous in nature, and can be found in animals, plants, bacteria, and fungi [2-5]. In these organisms, lectins are essential for mechanisms related to survival, sugar storage and immune system regulation [6-11]. Lectins also have multiple biotechnological potentials (as shown in Table 1) [3, 5, 12, 13]). In fact, the lectin-carbohydrates interactions make lectins important tools in cell biology, immunology, biochemistry, and genetics and in the development of therapeutic agents [2, 13-15].

*Address correspondence to this author at the Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, CEP 50670-420, Recife, PE, Brazil; Tel: +55 81 21268540; Fax: +55 81 21268576; E-mail: mtscorreia@gmail.com
[§]Equal contributors

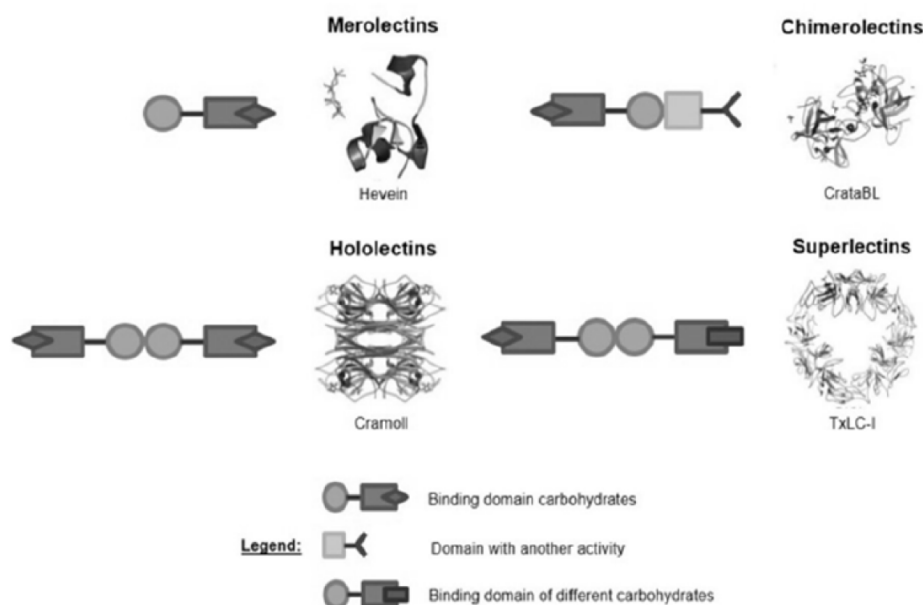


Fig. (1). Lectin classification by structure, depicting Hevein from *Hevea brasiliensis*, CrataBL from *Crataeva tapia*, Cramoll from *Cratylia mollis*, and TxLC-1 from *Tulipa gesneriana*. Adapted from Nascimento da Silva *et al.* [15].

One of the most intensively examined properties of lectins is their antitumor activity, which is characterized by their ability to recognize abnormal glycosylation patterns on the surface of cancer cell membranes [40, 41]. In this review, we discuss the importance of lectin-carbohydrate interactions and their potential applications in cancer diagnosis and treatment. We provide some insights into lectin recognition of the glycosylation patterns of tumor cells. Furthermore, we highlight the ability of lectins to direct nanoparticles (liposomes, solid lipid nanoparticles and other polymers) containing anticancer drugs and the development of drug delivery system (liposomes, alginate/chitosan microcapsules, alginate beads) carrying antitumor lectins.

2. CHANGES IN THE GLYCOSYLATION PATTERNS OF TUMOR CELLS CAN BE DETECTED BY LECTINS

Carbohydrates are present in all cell types and they are among the most abundant biomolecules found in nature. They have several functional characteristics as a result of their vast structural diversity. However, possibly the most intriguing feature of carbohydrates is that they are not directly encoded by the genome, and therefore, the wide variety of biological information that they carry is determined by modifications made by glycosyltransferases and glycosidases, enzymes that are

encoded by the genetic code (for review see [14, 42, 43]).

In what concerns the impact of carbohydrates in science, it is important to highlight the structural fundamentals underlying these biomolecules. Biological carbohydrates are usually pentoses or hexoses, (monomers with five and six carbon units, respectively) which can be found in linear forms and even as cyclic five-membered (furanose) or six-membered (pyranose) rings. These monosaccharides give much information about the high flexibility and conformational diversity of the carbohydrate family. The complexity associated with carbohydrate's structure increases when larger and complex chains - namely oligosaccharides or polysaccharides - are formed; in this case, the diversity, flexibility, and complexity (both chemical and structural) of them are spectacular. While proteins or DNA strands grow along one direction, complex chains of carbohydrates often feature branched, multidirectional structures. This is probably one reason why carbohydrates are given the role of carrying rich and subtle molecular information *via* the glycode [42].

Thus, the glycode could be considered a versatile platform based on the structural properties of carbohydrates. Traditionally, these biomolecules were thought to be inert, passive compounds; however, our more recent understanding of the importance and versatility of them has led to the suggestion that they should be con-

Table 1. Examples of the pharmacological activities of lectins.

Biological Activity	Species	Lectin(s)	Reference
Antibacterial	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (bacteria)	Llp1 and Llp2	[16]
	<i>Bauhinia variegata</i> (plant)	BVL-I	[17]
Anticoagulant	<i>Daboia ruselli</i> (snake)	RVsnaclec	[18]
	<i>Crataeva tapia</i> (plant)	CrataBL	[19]
Antifungal	<i>Crenomytilus grayanus</i> (mussel)	CGL	[20]
Anti-inflammatory	<i>Solieria filiformis</i> (alga)	SfL	[21]
	<i>Bauhinia bauhinoides</i> (plant)	BBL	[22]
Antinociceptive	<i>Andira anthelmia</i> (plant)	AAL	[23]
	<i>Caulerpa cupressoides</i> (alga)	CcL	[24]
	<i>Solieria filiformis</i> (alga)	SfL	[21]
Antioxidant	<i>Cratylia mollis</i> (plant)	Cramoll	[25]
	<i>Phaseolus vulgaris</i> (plant)	PHA	[26]
Anti-parasite	<i>Cratylia mollis</i> (plant)	Cramoll	[27, 28]
	<i>Urtica dioica</i> (plant)	UDA	[29]
Antitumoral	<i>Bothrops leucurus</i> (snake)	BIL	[30]
	<i>Boletus edulis</i> (mushrooms)	BEL	[31]
Antiviral	<i>Griffithsia</i> sp. (alga)	Griffithsin	[32]
	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>P. mandelii</i> <i>P. taiwanensis</i> (bacteria)	PFL; PML and PTL	[33]
	<i>Canavalia brasiliensis</i> (plant)	ConBr	[34]
Immunomodulatory	<i>Cratylia mollis</i> (plant)	Cramoll	[35]
	<i>Canavalia virosa</i> (plant)	<i>Canavalia virosa</i> lectin	[36]
Insecticide	<i>Moringa oleifera</i> (plant)	cMoL	[37]
	<i>Cratylia mollis</i> (plant)	Cramoll	[38]
Wound healing	<i>Cratylia mollis</i> (plant)	Cramoll	[38]
	<i>Parkia pendula</i> (plant)	<i>Parkia pendula</i> seed lectin	[39]

sidered the third component of the molecular alphabet of life (after nucleic acids and proteins). For example, each ring of a carbohydrate molecule contains several hydroxyl groups that have the ability to form glycosidic linkages with other sugar molecules. These many possible combinations result in a coding capacity far beyond that of the simple sequence permutations of nucleic acids and proteins. Furthermore, their ability to incorporate additional molecular groups, including phosphate and sulfate derivatives, exponentially increase their potential biochemical diversity [44-48].

Changes in sugar domain distribution on the cell surface can occur during normal cell development and can have important physiological functions [49, 50]. In

fact, this is entirely predicted, since the surface of the cellular network in humans, bacterial and viral pathogens, and the backbone of most proteins and lipids, is complemented by the glycocalyx, a sugar structure that reflects the inherent complexity of carbohydrate chains, as well as their topology and flexibility, and also confirms their ubiquitous presence in nature. This complex structure is composed by mono, oligo or polysaccharides, providing a biological information transfer system beyond the genetic code, and being fundamental to the mediation and modulation of physiology and cellular function [51, 52].

Healthy, non-cancerous cells have multiple layers of regulation that prevents them from becoming malignant

and invading the surrounding tissue. However, if a genetic alteration occurs, these healthy cells may begin to express increased levels of several growth factors and will no longer respond to tumor suppressing genes [49, 50, 53-55]. One of the most common phenotypic changes that occur, resulting in malignancy, is the alteration of the glycosylation patterns at cell surface. Several studies have shown that there are changes in cell membrane glycosylation patterns during malignant cell transformation and metastasis and in the expression levels of several endogenous lectins [56-58].

It is possible to understand a process catalyzed by various glycosyltransferase enzymes which are mostly located in the Golgi apparatus in cells. Glycoproteins, glycolipids, and proteoglycans are examples of complex molecules glycosylated by these enzymes. Pathophysiological situations, including cancer types, present alterations in glycosyltransferases activity and their gene expression. In addition, the activity of glycosyltransferases is controlled by various factors such as the levels of nucleotide sugars, acceptor substrates, nucleotide sugar transporters, chaperons, and endogenous lectin in cancer cells. The glycosylation results in various functional changes of glycoproteins including cell surface receptors and adhesion molecules such as E-cadherin and integrins. These changes confer the unique characteristic phenotypes associated with cancer cells [59]. The altered glycosylation patterns in cell membrane components affect vital biological processes due to the fundamental role of carbohydrates, i.e., their action as key modulators in intra- and inter-cellular routing, molecular and cellular interactions, as well as initiation of signal transduction. In addition, the most important changes, beyond oncogenic transformation and metastasis, include almost all innate and adaptive immunological events such as cellular communication, proliferation, adhesion, apoptosis, infiltration and inflammation [52, 60].

In this context, most diseases could be directly, or even indirectly, associated with alterations of the sugar profiles of the cell surface and/or secreted glycoconjugates, in particular glycoproteins. This implies that lectins have the ability to decipher the so-called glycode [42, 52]. Thus, the sugar binding capabilities of lectins have been exploited in the development of new strategies for cancer diagnosis [61-63], such as histopathology probes (including colorimetric, luminescent and fluorometric approaches) [64-66], lectin-based microarray [67-69] and biosensors [70-72]. Table 2 depicts several examples of lectins that have been used in the development of biosensors to detect cancer. These

lectin-based biosensors have been successfully used to detect several cancer types, including lymphoma [73], leukemia [74], and adenocarcinoma [75].

3. LECTINS AND DEVELOPMENT OF FUNCTIONALIZED NANOPARTICLES FOR ANTI-CANCER DRUG DELIVERY

Since lectins bind specifically and reversibly, to multiple carbohydrate residues present in cancer cells membrane, they have significant promise in the development of functionalized system for delivery of anti-cancer agents [5, 83]. This approach is termed *reverse lectin targeting* and is based on the ability of lectin to direct the nanoparticle to specific carbohydrates present at cancer cell surface [45, 83-85]. The lectin functionalized nanoparticles offer advantages such as the prevention of side effects, the improvement of drug uptake, bioavailability and efficacy [84, 86]. Herein we provide some examples of nanoparticles modified by lectins in order to improve drug delivery and efficacy.

3.1. Modification of Lipid-Based Nanoparticles with Lectins for Drug Delivery

Liposomes have been shown to be efficient drug delivery vectors because they can encapsulate both hydrophilic and hydrophobic molecules [87]. Liposomes have been modified by surface ligands (lectins, antibodies, etc.) to interact with specific cellular receptors resulting in the improvement of carrier internalization and intracellular drug release [88-90]. For instance, concanavalin A (ConA), the famous lectins isolated from *Canavalia ensiformis*, has been used to direct liposomes containing the drug doxorubicin (DOX). This combinatorial approach increased drug penetration, which in turn increased cytotoxicity, and resulted in the inhibition of cell proliferation by approximately 70% in Hep-2 cells (a tumor cell line derived from human laryngeal carcinoma)[91].

Another example is the use of wheat germ agglutinin (WGA from *Triticum vulgare*) to modify liposomes carrying the anticancer agent topotecan (topoisomerase I inhibitor) [92] for treatment of brain tumors. In this paper, the liposomes were also modified by insertion of tamoxifen (TAM) into lipid bilayer membrane. The dual modification aimed to improve the drug delivery by (i) inhibiting multidrug resistance proteins with TAM and (ii) promoting drug endocytosis with WGA. Indeed, this system resulted in the improvement of animal survival due the enhancement of drug transport across the blood-brain barrier [93]. Similarly, WGA-TAM modified liposomes were used to

Table 2. Examples of lectins used in the development of biosensors for the detection of cancer.

Species	Lectin name	Sugar specificity	Tumor detected	Reference
<i>Artocarpus heterophyllus</i>	ArtinM	D-mannose	Leukemia	[73]
<i>Canavalia ensiformis</i>	concanavalin A	D-mannose	Carcinoma and adenocarcinoma	[74]
			Liver cancer cell	[76]
<i>Cratylia mollis</i>	Cramoll 1,4	D-mannose	Prostate cancer	[71]
<i>Helix pomatia</i>	<i>Helix pomatia</i> agglutinin	N-acetyl-glucosamine	Colorectal cancer	[77]
<i>Lotus tetragonolobus</i>	<i>L. tetragonolobus</i> agglutinin	Glycoproteins containing sialic acid	Prostate cancer	[78]
<i>Maackia amurensis</i>	<i>M. amurensis</i> agglutinin	Glycoproteins containing sialic acid	Prostate cancer	[78]
<i>Sambucus nigra</i>	<i>S. nigra</i> agglutinin	Glycoproteins containing sialic acid	Carcinomas	[79]
			Cancer Cells Derived From Human Lung, Liver, And Prostate	[80]
			Prostate Cancer	[78]
<i>Triticum vulgare</i>	Wheat germ agglutinin	N-acetyl-glucosamine	Lymphoma cancer	[81]
			Colon Adenocarcinoma and Ovary Adenocarcinoma Cells	[75]
			Different Types Of Cancers	[82]

carry the drugs daunorubicin (inhibitor of nucleic acids synthesis) [94] and quinacrine (apoptosis inducer) [95] for treating brain glioma and glioma stem cells [96].

Other studies have evaluated the potential that *Bauhinia purpurea* agglutinin (BPA)-modified liposomes may have in the treatment of human prostate cancer. BPA recognizes galactosyl glycoproteins and glycolipids. This lectin has been shown to bind to human prostate cancer cells but not to normal human prostate cells. BPA-PEG modified liposomes accumulated in prostate cancer tissues. DOX encapsulated in BPA-PEG conjugated liposomes suppressed the growth of DU145 cancer cells. Furthermore, BPA binds more strongly to lung, breast, colon, and bladder cancer tissue cells as compared to normal tissue cells. These results suggest that BPA may be utilized as a targeted probe for the detection of a wide spectrum of cancers [97].

Liposomes modified with a lectin from *Lotus tetragonolobus* (LTL) were found to bind glycans containing alpha-1,2-linked fucose, and were shown to be able to recognize surface-regionalized glycoepitopes that are only found in limited regions close to the nuclei of highly proliferative cells [98]. These LTL-modified liposomes increased the rate of intracellular delivery of

DOX via a network of tubules that never fused with the lysosomes. In an *in vivo* model of melanoma in mice, these LTL-modified liposomes specifically delivered loaded DOX to the cytoplasm of tumor cells [99]. Another example is the modification of cationic liposomes carrying vinblastine (anti-microtubule drug) with peanut agglutinin (PNA) to treat non-small cell lung cancer [100]. Finally, it is also important to highlight that lectin-modified liposomes have also been used in cancer diagnosis, as performed using the lectin from *Ulex europaeus* (UEA) for diagnosis of adenomatous polyps [101].

Besides liposomes, other lipid based formulations have been used as drug nanocarriers such as solid lipid nanoparticles (SLNs). SLNs have been proposed to overcome some limitation of liposomal formulations including physical stability, encapsulation efficacy, bioavailability, cell absorption, etc. (for detailed review see [102-104]). In this sense, WGA-conjugated SLNs were used to improve efficacy of paclitaxel (PTX), a plant-derived hydrophobic drug [105]. WGA-conjugated, PTX-loaded SLNs showed higher anticancer action towards A549 lung cancer cells than free PTX, attributed to improvement of drug delivery,

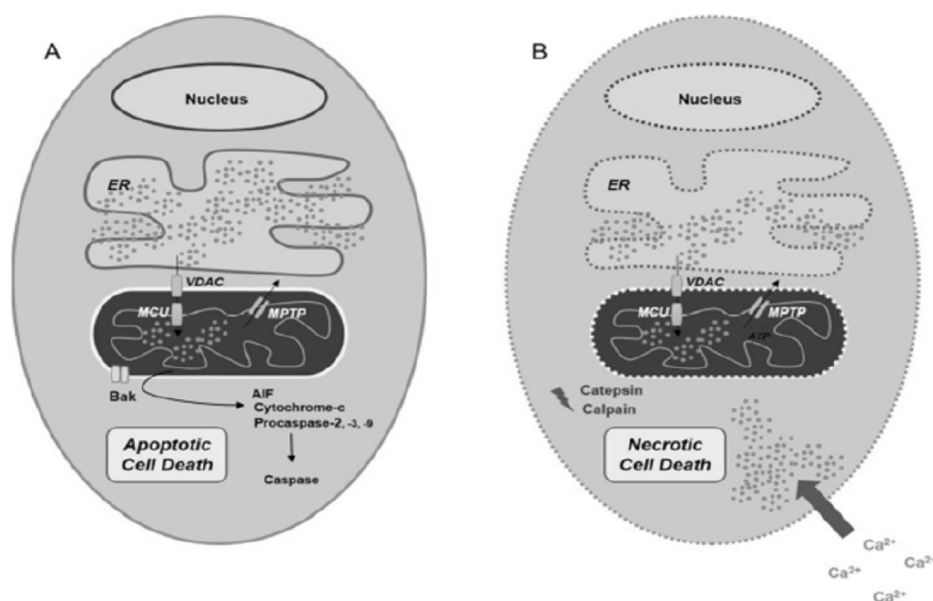


Fig. (2). Schematic representation of the ionic changes, concentration of cytosolic and mitochondrial calcium, activation of proteolytic enzymes, opening of the mitochondrial permeability transition pore, release apoptosis inducing factors, and ATP depletion during apoptotic (A) and necrotic (B) cell death. Legend: AIF = apoptosis-inducing factor; BAK = Bcl-2 Homologous Antagonist/Killer, a pro-apoptotic protein; ER = Endoplasmic reticulum; MCU = mitochondrial calcium uniporter; MPTP = mitochondrial permeability transition pore; VDAC = voltage dependent anion channel;

bioavailability and targetability of this nanosystem [86]. WGA was also employed to promote bioadhesion and bioavailability of lipid nanoparticles for oral delivery of bufalin [106], oridonin [107].

3.2. Other Nanoparticles Modified by Lectins

Lectins have been also used to enhance the efficacy of Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles. PLGA is a copolymer highlighted in drug delivery due several properties including biodegradability and biocompatibility [108-110]. Yin *et al.* [111] showed that PGLA-nanoparticles conjugated with lectins (WGA, tomato lectin and asparagus pea lectin) had better adherence to gastrointestinal mucosa after oral administration. In addition, WGA-functionalized PLGA were used for oral delivery of thymopentin [111, 112], intracellular delivery of paclitaxel to colon cancer cells [113] and lung cells [114]. WGA-conjugated PLGA also enhanced the action of stearyl gemcitabine on urothelial cells [115]. Initially, the authors showed that the encapsulation efficiency was higher for the amphiphilic 4-(N)-stearyl prodrug of gemcitabine GEM-C18 than for mitomycin C, doxorubicin, and gemcitabine hydrochloride. WGA-GEM-C18-PGLA nanoparticles showed higher levels of adhesion and cytotoxicity [115, 116].

One emerging strategy to improve the drug delivery in the brain is the nasal administration of PLGA or poly (ethylene glycol)-poly (lactic acid) (PEG-PLA) nanoparticles conjugated with lectins such as *Solanum tuberosum* lectin (SLT) [117], ConA [118], WGA [119] and *Ulex europaeus* agglutinin I (UEA I) [120]. Actually, WGA-surface-functionalized PEG-PLA nanoparticles and SLT-modified PLGA nanoparticles were able to enhance the brain delivery of a neuroprotective peptide [121] and coumarin-6 [117], respectively. These results illustrate the potential of these drug delivery system for treat brain pathologies.

Another example is about the encapsulation of curcumin, a plant polyphenol with broad-spectrum anti-cancer action; however, its physical-chemical features (high hydrophobicity, rapid degradation, low bioavailability, etc.) limit its therapeutic administration [122, 123]. Several nanosystems have been developed to improve the efficacy of curcumin, one of them employed ConA to modify bacterial poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) PHBHHx loaded with curcumin for the *in vitro* treatment of breast cancer. This formulation exhibited stability and higher antitumor activity than curcumin carried in unmodified PHBHHx nanoparticles [124].

4. ENCAPSULATION OF ANTICANCER LECTINS

The focus on the role of plant lectins in cancer therapy has increased since 1960, after it was found that the *Phaseolus vulgaris* agglutinin (PHA) could stimulate mitotic division in lymphocytes and WGA and ConA had the ability to agglutinate transformed cells [2, 5]. Since then, several lectins have been shown to be mitogenic for non-tumor cell lines, while others are cytotoxic to cancer cells and endogenous lectins are target for therapy [125-131]. For some anticancer lectins, the mechanisms associated to cell death induction have been established as illustrated in (Fig. 3 and Fig. 4). In this section, we provide some example of systems used for improve *in vivo* lectin anticancer activity. When available, the molecular mechanism involved in the lectin action is described.

4.1. *Cratylia mollis* Lectins Encapsulated in Liposomes Showed Improved Anticancer Activity

Seeds of *Cratylia mollis*, a native plant from Brazil, have been used to purify lectins with high biotechnological potential [15]. Andrade *et al.* [132] examined the anticancer potential of free and encapsulated Cramoll 1,4 (preparations containing the isolectins 1 and -4 isolated from *Cratylia mollis* seeds). Cramoll

1,4 strongly binds to transformed cells, including those from the breast, uterus, brain [133]. It has also been shown to bind prostate tissues, and has the potential to be a strong candidate in the development of immunohistochemical probes and cancer biosensors [64, 71]. Free Cramoll 1,4 inhibited sarcoma growth in mice by approximately 43%. However, when this lectin was encapsulated in a positively charged liposome, this growth inhibition increased to approximately 71%.

Later, a different approach was used to encapsulate the recombinant form of Cramoll isolectin 1 (rCramoll). rCramoll-loaded stealth liposomes was formulated by the hydration of the lipid film, followed by several cycles of freezing and thawing. An illustrative model of this nanosystem is shown in Fig. (5). A higher encapsulation ratio (approximately about 60%) was found for rCramoll than that reported for pCramoll. Furthermore, the rCramoll-loaded stealth liposomes displayed physicochemical features (*e.g.* particle size, polydispersity index, and pH) suitable for *in vivo* administration. The encapsulation of rCramoll in stealth liposomes enhanced antitumor activity and reduced toxicity, and was more successful than the previous results reported for Cramoll 1,4 loaded into conventional liposomes [132, 134].

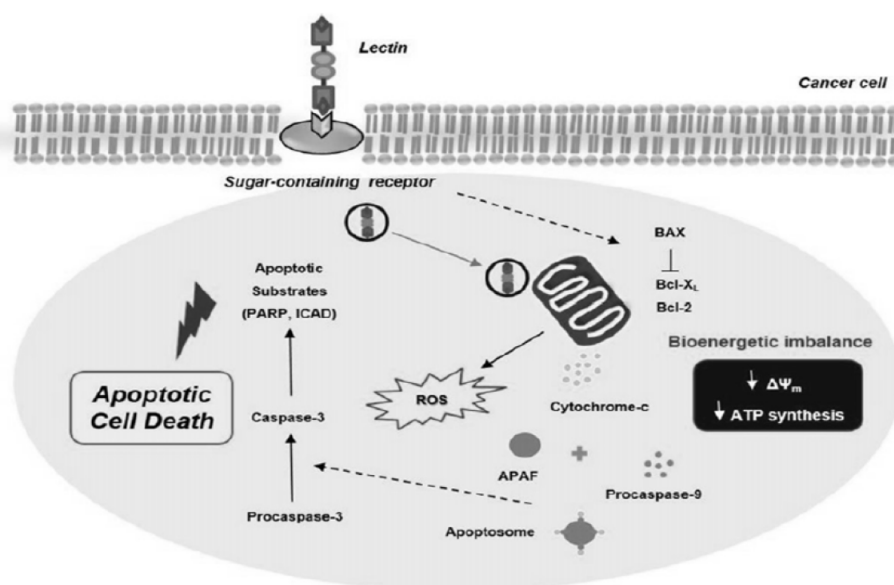


Fig. (3). Model of lectin-induced apoptosis *via* the mitochondrial pathway in tumor cells. A lectin binds to sugar containing receptor(s) present at cell surface and trigger different metabolic pathways that induce imbalance in mitochondrial bioenergetic resulting in overproduction of reactive oxygen species (ROS) and release of pro-apoptotic factors. Legend: $\Delta\Psi_m$ = mitochondrial membrane potential; APAF = apoptotic protease activating factor; Bcl2 = B-cell lymphoma 2 protein; BAX = Bcl-2-associated X protein; ICAD = Inhibitor of caspase-activated DNase; PARP = Poly (ADP-ribose) polymerase; ROS = reactive oxygen species.

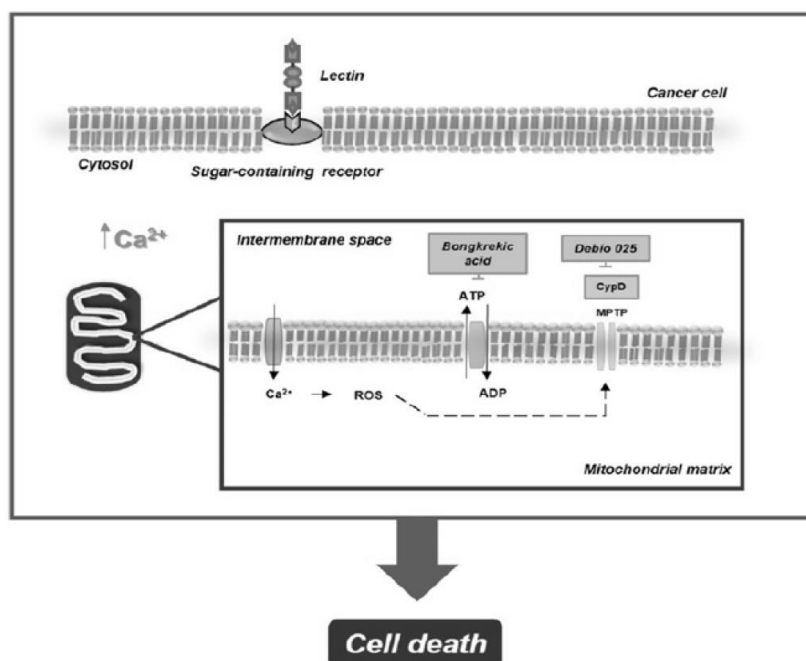


Fig. (4). Model of lectin-induced necrosis. Lectins induce necrosis mainly *via* the mitochondrial pathway through an increase in cytosolic calcium and reactive oxygen species (ROS) in tumor cells. Debio 025 and bongkreic acid are inhibitors of mitochondrial permeability transition (MPT) widely used to evaluate the role of MPT in cell death induced by a compound (such as lectin).

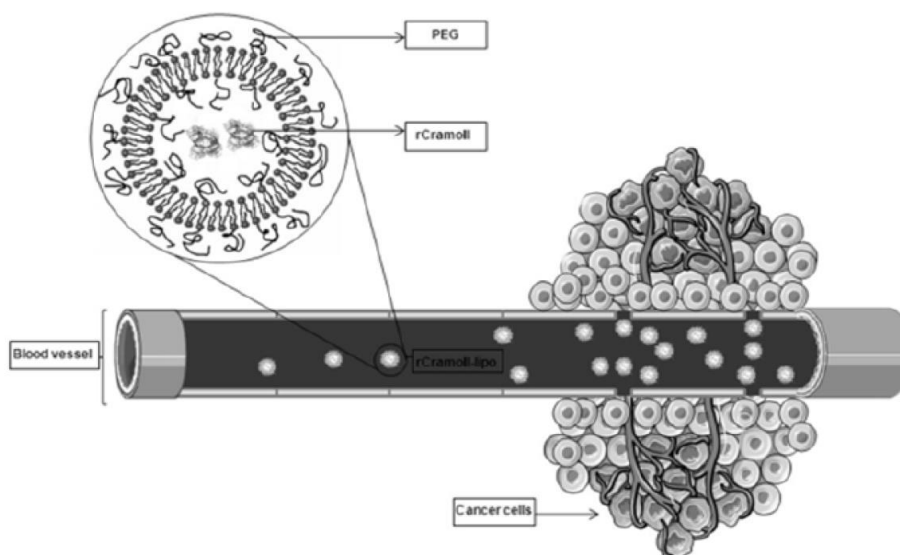


Fig. (5). Illustrative model of rCramoll-loaded stealth liposomes. rCramoll: recombinant lectin from *Cratylia mollis*; PEG: polyethylene glycol.

4.2. Development of Anticancer Agents Using *Viscum album* Agglutinin

The lectin VCA is extracted from mistletoe (*Viscum album* L. *coloratum*) and classified as type II ribosome-inactivating proteins (RIPsII). VCA induces apoptotic

cell death through caspase activation in several cancer cell lines such as human myelocytic leukemia cells (HL-60) and B16BL6 and B16F10 melanoma cells [135, 136]. VCA has been shown to induce apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells (SK-Hep-1

and Hep3B lines) through the activation of Bax and the inhibition of Bcl-2 [135, 137]. *In vivo*, VCA inhibits cancer metastasis by increasing apoptosis and inhibiting angiogenesis [138]. In addition, VCA exhibited synergistic anticancer effects with DOX against MCF-7 (estrogen receptor-positive) and MDA-MB231 (estrogen receptor-negative) human breast cancer cells [139].

In order to improve the stability of VCA in the gastrointestinal tract and to enable its oral administration, this lectin was encapsulated in alginate/chitosan microcapsules and in enteric coated granules. Alginate/chitosan microcapsules protected VCA from degradation at acidic pH values. However, the best results were obtained by VCA-containing granules coated with biodegradable polymer Eudragit that presented better release profiles with minimal losses of cytotoxicity against SK-Hep-1 human hepatocarcinoma cell lines [140]. These results encouraged the application of the VCA-containing granules coated with Eudragit in *in vivo* models. The oral administration of this formulation (430 mg/kg/day) was able to reduced B16F10 melanoma tumor volume and improves mice survival [136].

4.3. Anticancer Lectin from *Pisum sativum* and its Microencapsulation in Alginate Beads

Another anticancer lectin was purified from Pea (*Pisum sativum* L.). This lectin showed *in vitro* and *in vivo* inhibitory effects towards Ehrlich ascites carcinoma (EAC). The *in vitro* action was associated with cell cycle arrest at G2/M phase and expression of apoptosis-related genes (Bcl-2, Bcl-X and Bax). Pea lectin induced tumor growth inhibition of 63% and 44% when administered in mice during 5 days at 2.8 mg/kg/day and 1.4 mg/kg/day (i.p.), respectively [141]. *P. sativum* lectin is also able to active the apoptosis pathway in HepG2 cells through up-regulation of p53. This lectin was efficiently encapsulated into alginate microbeads, showing sustained release profile. The authors highlighted that the process is feasible in an industrial scale which makes the lectin-alginate microbeads an interesting candidate for anticancer agent development based in the oral [142].

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

The glycosylation pattern present in cell surface provides essential information about physiological/pathological process. Particularly, cancer cells exhibit abnormal glycosylation pattern that can be exploited for therapy and diagnosis. Several lectins (translators of sugar code) have gained increasing im-

portance in cancer research as lectins-carbohydrate interactions are relevant for development of histopathologic probes and biosensors. The ability of lectins to recognize differentially expressed sugar in cancer cells are also used to enhance the efficacy of anticancer drugs. In these cases, polymeric formulations carrying anticancer drugs are direct to cancer cells by lectins. On the other hand, some lectins can inhibit cancer growth (through different pathways) and, as promising alternative drugs, these lectins were encapsulated in polymers. The selection of the most efficacious methodology for the encapsulation of these hydrophilic proteins is one of the most crucial and challenging steps in their development. In both cases (lectin-conjugated polymers or encapsulated lectins), these new pharmaceutical preparations showed improved intracellular delivery, bioavailability and targetability leading to enhanced therapeutic index and significantly less side effects. From the fundamental point of view, it was remarkable to note that several challenges still need to be overcome, including low encapsulation efficiency and protein instability during preparation, especially when the preparation conditions have the potential to cause damage to the protein, or involve organic solvents.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the following Brazilian agencies: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão (FAPEMA), and Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE).

REFERENCES

- [1] Peumans, W.J.; Van Damme, E.J.; Barre, A.; Rouge, P., Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. *Advances in experimental medicine and biology*, **2001**, 491, 27-54.
- [2] Manning, J.C.; Romero, A.; Habermann, F.A.; Garcia Caballero, G.; Kaltner, H.; Gabius, H.J., Lectins: a primer for histochemists and cell biologists. *Histochemistry and cell biology*, **2017**, 147, (2), 199-222.

- [3] Dias Rde, O.; Machado Ldos, S.; Migliolo, L.; Franco, O.L., Insights into animal and plant lectins with antimicrobial activities. *Molecules*, **2015**, *20*, (1), 519-541.
- [4] Sabotic, J.; Ohm, R.A.; Kunzler, M., Entomotoxic and nematotoxic lectins and protease inhibitors from fungal fruiting bodies. *Applied microbiology and biotechnology*, **2016**, *100*, (1), 91-111.
- [5] Coelho, L.C.; Silva, P.M.; Lima, V.L., Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. **2017**, *2017*, 1594074.
- [6] Ng, T.B.; Fai Cheung, R.C.; Wing Ng, C.C.; Fang, E.F.; Wong, J.H., A review of fish lectins. *Current protein & peptide science*, **2015**, *16*, (4), 337-351.
- [7] De Schutter, K.; Van Damme, E.J., Protein-carbohydrate interactions as part of plant defense and animal immunity. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **2015**, *20*, (5), 9029-9053.
- [8] Singh, S.S.; Cheung, R.C.; Wong, J.H.; Ng, T.B., Mannose Binding Lectin: A Potential Biomarker for Many Human Diseases. *Current medicinal chemistry*, **2016**, *23*, (33), 3847-3860.
- [9] He, X.; Li, L.; Xu, H.; Xi, J.; Cao, X.; Xu, H.; Rong, S.; Dong, Y.; Wang, C.; Chen, R.; Xu, J.; Gao, X.; Xu, Z., A rice jacalin-related mannose-binding lectin gene, OsJRL, enhances *Escherichia coli* viability under high salinity stress and improves salinity tolerance of rice. *Plant biology (Stuttgart, Germany)*, **2017**, *19*, (2), 257-267.
- [10] Loh, S.H.; Park, J.Y.; Cho, E.H.; Nah, S.Y.; Kang, Y.S., Animal lectins: potential receptors for ginseng polysaccharides. *Journal of ginseng research*, **2017**, *41*, (1), 1-9.
- [11] Mayer, S.; Raulf, M.K.; Lepenies, B., C-type lectins: their network and roles in pathogen recognition and immunity. *Histochemistry and cell biology*, **2017**, *147*, (2), 223-237.
- [12] da Silva, L.C.; Correia, M.T., Plant lectins and Toll-like receptors: implications for therapy of microbial infections. *Front Microbiol*, **2014**, *5*, 20.
- [13] Dan, X.; Liu, W.; Ng, T.B., Development and Applications of Lectins as Biological Tools in Biomedical Research. *Medicinal research reviews*, **2016**, *36*, (2), 221-247.
- [14] Gabius, H.J.; Manning, J.C.; Kopitz, J.; Andre, S.; Kaltner, H., Sweet complementarity: the functional pairing of glycans with lectins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, **2016**, *73*, (10), 1989-2016.
- [15] Nascimento da Silva, L.C.; Bezerra Filho, C.M.; de Paula, R.A.; Breitenbach Barroso Coelho, L.C.; Vanusa da Silva, M.; dos Santos Correia, M.T., Cratylia mollis lectin: a versatile tool for biomedical studies. *Current Bioactive Compounds*, **2014**, *10*, (1), 11.
- [16] Petrova, M.I.; Imholz, N.C.; Verhoeven, T.L.; Balzarini, J.; Van Damme, E.J.; Schols, D.; Vanderleyden, J.; Lebeer, S., Lectin-Like Molecules of *Lactobacillus rhamnosus* GG Inhibit Pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* Biofilm Formation. *PLoS one*, **2016**, *11*, (8), e0161337.
- [17] Klafke, G.B.; Moreira, G.M.; Pereira, J.L.; Oliveira, P.D.; Conceicao, F.R.; Lund, R.G.; Grassmann, A.A.; Dellagostin, O.A.; da Silva Pinto, L., Lectin I from *Bauhinia variegata* (BVL-I) expressed by *Pichia pastoris* inhibits initial adhesion of oral bacteria *in vitro*. *International journal of biological macromolecules*, **2016**, *93*, (Pt A), 913-918.
- [18] Mukherjee, A.K.; Dutta, S.; Mackessy, S.P., A new C-type lectin (RVsnaclec) purified from venom of *Daboia russelii russelii* shows anticoagulant activity *via* inhibition of FXa and concentration-dependent differential response to platelets in a Ca(2+)-independent manner. *Thrombosis research*, **2014**, *134*, (5), 1150-1156.
- [19] Salu, B.R.; Ferreira, R.S.; Brito, M.V.; Ottaiano, T.F.; Cruz, J.W.; Silva, M.C.; Correia, M.T.; Paiva, P.M.; Maffei, F.H.; Oliva, M.L., CrataBL, a lectin and Factor Xa inhibitor, plays a role in blood coagulation and impairs thrombus formation. *Biological chemistry*, **2014**, *395*, (9), 1027-1035.
- [20] Chikalovets, I.V.; Chernikov, O.V.; Pivkin, M.V.; Molchanova, V.I.; Litovchenko, A.P.; Li, W.; Lukyanov, P.A., A lectin with antifungal activity from the mussel *Crenomytilus grayanus*. *Fish & shellfish immunology*, **2015**, *42*, (2), 503-507.
- [21] Abreu, T.M.; Ribeiro, N.A.; Chaves, H.V.; Jorge, R.J.; Bezerra, M.M.; Monteiro, H.S.; Vasconcelos, I.M.; Mota, E.F.; Benevides, N.M., Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of the Lectin from Marine Red Alga *Solieria filiformis*. *Planta medica*, **2016**, *82*, (7), 596-605.
- [22] Girao, D.K.; Cavada, B.S.; de Freitas Pires, A.; Martins, T.V.; Franco, A.X.; Morais, C.M.; Santiago do Nascimento, K.; Delatorre, P.; da Silva, H.C.; Nagano, C.S.; Assreuy, A.M.; Soares, P.M., The galactose-binding lectin isolated from *Bauhinia bauhinioides* Mart seeds inhibits neutrophil rolling and adhesion *via* primary cytokines. *Journal of molecular recognition : JMR*, **2015**, *28*, (5), 285-292.
- [23] Nascimento, K.S.; Nascimento, F.L.; Silva, M.T.; Nobre, C.B.; Moreira, C.G.; Brizeno, L.A.; da Ponte, E.L.; Assreuy, A.M.; Cavada, B.S., Purification of a thermostable antinociceptive lectin isolated from *Andira anthelmia*. *Journal of molecular recognition : JMR*, **2016**, *29*, (6), 248-252.
- [24] Vanderlei, E.S.; Patoilo, K.K.; Lima, N.A.; Lima, A.P.; Rodrigues, J.A.; Silva, L.M.; Lima, M.E.; Lima, V.; Benevides, N.M., Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. *International immunopharmacology*, **2010**, *10*, (9), 1113-1118.
- [25] da Silva, L.C.; Alves, N.M.; de Castro, M.C.; Higino, T.M.; da Cunha, C.R.; Pereira, V.R.; da Paz, N.V.; Coelho, L.C.; Correia, M.T.; de Figueiredo, R.C., pCramoll and rCramoll as New Preventive Agents against the Oxidative Dysfunction Induced by Hydrogen Peroxide. *Oxidative medicine and cellular longevity*, **2015**, *2015*, 520872.
- [26] Carrasco-Castilla, J.; Hernandez-Alvarez, A.J.; Jimenez-Martinez, C.; Jacinto-Hernandez, C.; Alajz, M.; Giron-Calle, J.; Vioque, J.; Davila-Ortiz, G., Antioxidant and metal chelating activities of peptide fractions from phaseolin and bean protein hydrolysates. *Food chemistry*, **2012**, *135*, (3), 1789-1795.
- [27] Fernandes, M.P.; Inada, N.M.; Chiaratti, M.R.; Araujo, F.F.; Meirelles, F.V.; Correia, M.T.; Coelho, L.C.; Alves, M.J.; Gadelha, F.R.; Vercesi, A.E., Mechanism of Trypanosoma cruzi death induced by Cratylia mollis seed lectin. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, **2010**, *42*, (1), 69-78.
- [28] Fernandes, M.P.; Leite, A.C.; Araujo, F.F.; Saad, S.T.; Barratti, M.O.; Correia, M.T.; Coelho, L.C.; Gadelha, F.R.; Vercesi, A.E., The Cratylia mollis seed lectin induces membrane permeability transition in isolated rat liver mitochondria and a cyclosporine a-insensitive permeability transition in Trypanosoma cruzi mitochondria. *The Journal of eukaryotic microbiology*, **2014**, *61*, (4), 381-388.
- [29] Castillo-Acosta, V.M.; Ruiz-Perez, L.M.; Van Damme, E.J.; Balzarini, J.; Gonzalez-Pacanoska, D., Exposure of Trypanosoma brucei to an N-acetylglucosamine-binding lectin induces VSG switching and glycosylation defects resulting in reduced infectivity. *PLoS neglected tropical diseases*, **2015**, *9*, (3), e0003612.
- [30] Aranda-Souza, M.A.; Rossato, F.A.; Costa, R.A.; Figueira, T.R.; Castilho, R.F.; Guarniere, M.C.; Nunes, E.S.; Coelho, L.C.; Correia, M.T.; Vercesi, A.E., A lectin from Bothrops leucurus snake venom raises cytosolic calcium levels and promotes B16-F10 melanoma necrotic cell death *via* mitochondrial permeability transition. *Toxicon : official journal*

- of the International Society on Toxinology, **2014**, 82, 97-103.
- [31] Bovi, M.; Cenci, L.; Perduca, M.; Capaldi, S.; Carrizo, M.E.; Civiero, L.; Chiarelli, L.R.; Galliano, M.; Monaco, H.L., BEL beta-trefoil: a novel lectin with antineoplastic properties in king bolete (*Boletus edulis*) mushrooms. *Glycobiology*, **2013**, 23, (5), 578-592.
- [32] Barton, C.; Kouokam, J.C.; Hurst, H.; Palmer, K.E., Pharmacokinetics of the Antiviral Lectin Griffithsin Administered by Different Routes Indicates Multiple Potential Uses. *Viruses*, **2016**, 8, (12).
- [33] Morimoto, K.; Sato, Y., Anti-influenza virus activity of high-mannose binding lectins derived from genus *Pseudomonas*. *Virus research*, **2016**, 223, 64-72.
- [34] Silva Fde, O.; Santos, P.; Figueiroa Ede, O.; de Melo, C.M.; de Andrade Lemoine Neves, J.K.; Arruda, F.V.; Cajazeiras, J.B.; do Nascimento, K.S.; Teixeira, E.H.; Cavada, B.S.; Porto, A.L.; Pereira, V.R., Antiproliferative effect of *Canavalia brasiliensis* lectin on B16F10 cells. *Research in veterinary science*, **2014**, 96, (2), 276-282.
- [35] da Silva, L.C.; Alves, N.M.; de Castro, M.C.; Pereira, V.R.; da Paz, N.V.; Coelho, L.C.; de Figueiredo, R.C.; Correia, M.T., Immunomodulatory effects of pCramoll and rCramoll on peritoneal exudate cells (PECs) infected and non-infected with *Staphylococcus aureus*. *Int J Biol Macromol*, **2015**, 72, 848-854.
- [36] Shanmugavel, S.; Velayutham, V.; Kamalanathan, T.; Periasamy, M.; Munusamy, A.; Sundaram, J., Isolation and analysis of mannose/trihalose/maltose specific lectin from jack bean with antitrichid activity. *International journal of biological macromolecules*, **2016**, 91, 1-14.
- [37] Agra-Neto, A.C.; Napoleao, T.H.; Pontual, E.V.; Santos, N.D.; Luz Lde, A.; de Oliveira, C.M.; de Melo-Santos, M.A.; Coelho, L.C.; Navarro, D.M.; Paiva, P.M., Effect of *Moringa oleifera* lectins on survival and enzyme activities of *Aedes aegypti* larvae susceptible and resistant to organophosphate. *Parasitology research*, **2014**, 113, (1), 175-184.
- [38] Albuquerque, P.B.S.; Soares, P.A.G.; Aragao-Neto, A.C.; Albuquerque, G.S.; Silva, L.C.N.; Lima-Ribeiro, M.H.M.; Silva Neto, J.C.; Coelho, L.C.B.B.; Correia, M.T.S.; Teixeira, J.A.C.; Carneiro-da-Cunha, M.G., Healing activity evaluation of the galactomannan film obtained from *Cassia grandis* seeds with immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. *Int J Biol Macromol*, **2017**, 102, 749-757.
- [39] Coriolano, M.C.; de Melo, C.M.; Silva Fde, O.; Schirato, G.V.; Porto, C.S.; dos Santos, P.J.; Correia, M.T.; Porto, A.L.; Carneiro-Leao, A.M.; Coelho, L.C., *Parkia pendula* seed lectin: potential use to treat cutaneous wounds in healthy and immunocompromised mice. *Appl Biochem Biotechnol*, **2014**, 172, (5), 2682-2693.
- [40] Freire-de-Lima, L.; Previato, J.O.; Mendonca-Previato, L., Editorial: Glycosylation Changes in Cancer: An Innovative Frontier at the Interface of Cancer and Glycobiology. *Frontiers in oncology*, **2016**, 6, 254.
- [41] Belicky, S.; Katrlík, J.; Tkáč, J., Glycan and lectin biosensors. *Essays in biochemistry*, **2016**, 60, (1), 37-47.
- [42] Cocinero, E.J.; Carcabal, P., Carbohydrates. *Topics in current chemistry*, **2015**, 364, 299-333.
- [43] Widmalm, G., A perspective on the primary and three-dimensional structures of carbohydrates. *Carbohydrate research*, **2013**, 378, 123-132.
- [44] Rudiger, H.; Siebert, H.C.; Solis, D.; Jimenez-Barbero, J.; Romero, A.; von der Lieth, C.W.; Diaz-Marino, T.; Gabius, H.J., Medicinal chemistry based on the sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. *Current medicinal chemistry*, **2000**, 7, (4), 389-416.
- [45] Gabius, H.J.; Siebert, H.C.; Andre, S.; Jimenez-Barbero, J.; Rudiger, H., Chemical biology of the sugar code. *Chembiochem: a European journal of chemical biology*, **2004**, 5, (6), 740-764.
- [46] Gabius, H.J.; Kayser, K., Introduction to glycopathology: the concept, the tools and the perspectives. *Diagnostic pathology*, **2014**, 9, 4.
- [47] Andre, S.; Kaltner, H.; Manning, J.C.; Murphy, P.V.; Gabius, H.J., Lectins: getting familiar with translators of the sugar code. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **2015**, 20, (2), 1788-1823.
- [48] Roy, R.; Murphy, P.V.; Gabius, H.J., Multivalent Carbohydrate-Lectin Interactions: How Synthetic Chemistry Enables Insights into Nanometric Recognition. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **2016**, 21, (5).
- [49] Corfield, A., Eukaryotic protein glycosylation: a primer for histochemists and cell biologists. *Histochemistry and cell biology*, **2017**, 147, (2), 119-147.
- [50] Kopitz, J., Lipid glycosylation: a primer for histochemists and cell biologists. *Histochemistry and cell biology*, **2017**, 147, (2), 175-198.
- [51] Varki, A., Nothing in glycobiology makes sense, except in the light of evolution. *Cell*, **2006**, 126, (5), 841-845.
- [52] Alavi, A.; Axford, J.S., Sweet and sour: the impact of sugars on disease. *Rheumatology (Oxford, England)*, **2008**, 47, (6), 760-770.
- [53] Munoz-Fontela, C.; Mandinova, A.; Aaronson, S.A.; Lee, S.W., Emerging roles of p53 and other tumour-suppressor genes in immune regulation. *Nature reviews. Immunology*, **2016**, 16, (12), 741-750.
- [54] Kumar, S.; Vijayan, M.; Bhatti, J.S.; Reddy, P.H., MicroRNAs as Peripheral Biomarkers in Aging and Age-Related Diseases. *Progress in molecular biology and translational science*, **2017**, 146, 47-94.
- [55] Newton, A.C.; Brognard, J., Reversing the Paradigm: Protein Kinase C as a Tumor Suppressor. *Trends in pharmacological sciences*, **2017**.
- [56] Kaltner, H.; Toegel, S.; Caballero, G.G.; Manning, J.C.; Ledeen, R.W.; Gabius, H.J., Galectins: their network and roles in immunity/tumor growth control. *Histochemistry and cell biology*, **2017**, 147, (2), 239-256.
- [57] Drabik, A.; Bodzon-Kulakowska, A.; Suder, P., Glycosylation Changes in Serum Proteins Identify Patients with Pancreatic Cancer. **2017**, 16, (4), 1436-1444.
- [58] Vajaria, B.N.; Patel, P.S., Glycosylation: a hallmark of cancer? *Glycoconjugate journal*, **2017**, 34, (2), 147-156.
- [59] Taniguchi, N.; Kizuka, Y., Glycans and cancer: role of N-glycans in cancer biomarker, progression and metastasis, and therapeutics. *Advances in cancer research*, **2015**, 126, 11-51.
- [60] Unione, L.; Gimeno, A.; Valverde, P.; Calloni, I.; Coelho, H.; Mirabella, S.; Poveda, A.; Arda, A.; Jimenez-Barbero, J., Glycans in Infectious Diseases. A molecular recognition perspective. *Current medicinal chemistry*, **2017**.
- [61] Gabius, H.J.; Andre, S.; Kaltner, H.; Siebert, H.C., The sugar code: functional lectinomics. *Biochimica et biophysica acta*, **2002**, 1572, (2-3), 165-177.
- [62] Gemeiner, P.; Mislovicova, D.; Tkac, J.; Svitel, J.; Papatrsty, V.; Hrabarova, E.; Kogan, G.; Kozar, T., Lectinomics II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. *Biotechnology advances*, **2009**, 27, (1), 1-15.
- [63] Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM.
- [64] de Lima, A.L.; Cavalcanti, C.C.; Silva, M.C.; Paiva, P.M.; Coelho, L.C.; Beltrao, E.I.; dos, S.C.M.T., Histochemical evaluation of human prostatic tissues with *Cratylia mollis* seed lectin. *Journal of biomedicine & biotechnology*, **2010**, 2010, 179817.

- [65] Andrade, C.G.; Cabral Filho, P.E.; Tenorio, D.P.; Santos, B.S.; Beltrao, E.I.; Fontes, A.; Carvalho, L.B., Jr., Evaluation of glyco phenotype in breast cancer by quantum dot-lectin histochemistry. *International journal of nanomedicine*, **2013**, *8*, 4623-4629.
- [66] da Silva, L.P.; de Almeida, S.M.; de Lima, L.R.; Cavalcanti Cde, L.; de Melo Lira, M.M.; da Silva Mda, P.; Beltrao, E.I.; de Carvalho Junior, L.B., Evaluation of glyco phenotype in prostatic neoplasm by chemiluminescent assay. *International journal of clinical and experimental pathology*, **2014**, *7*, (7), 3800-3808.
- [67] Li, X.; Guan, F.; Li, D.; Tan, Z.; Yang, G.; Wu, Y.; Huang, Z., Identification of aberrantly expressed glycans in gastric cancer by integrated lectin microarray and mass spectrometric analyses. *Oncotarget*, **2016**, *7*, (52), 87284-87300.
- [68] Syed, P.; Gidwani, K.; Kekki, H.; Leivo, J.; Pettersson, K.; Lamminmaki, U., Role of lectin microarrays in cancer diagnosis. *Proteomics*, **2016**, *16*, (8), 1257-1265.
- [69] Zou, X.; Yoshida, M.; Nagai-Okatani, C.; Iwaki, J.; Matsuda, A.; Tan, B.; Hagiwara, K.; Sato, T.; Itakura, Y.; Nuro, E.; Kaji, H.; Toyoda, M.; Zhang, Y.; Narimatsu, H.; Kuno, A., A standardized method for lectin microarray-based tissue glycome mapping. *Scientific reports*, **2017**, *7*, 43560.
- [70] Pihikova, D.; Kasak, P.; Tkac, J., Glycoprofiling of cancer biomarkers: Label-free electrochemical lectin-based biosensors. *Open chemistry*, **2015**, *13*, (1), 636-655.
- [71] Silva, P.M.; Lima, A.L.; Silva, B.V.; Coelho, L.C.; Dutra, R.F.; Correia, M.T., Cratylia mollis lectin nanoelectrode for differential diagnosis of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia based on label-free detection. *Biosensors & bioelectronics*, **2016**, *85*, 171-177.
- [72] Pihikova, D.; Pakanova, Z.; Nemcovic, M.; Barath, P.; Belicky, S.; Bertok, T.; Kasak, P.; Mucha, J.; Tkac, J., Sweet characterisation of prostate specific antigen using electrochemical lectin-based immunosensor assay and MALDI TOF/TOF analysis: Focus on sialic acid. *Proteomics*, **2016**, *16*, (24), 3085-3095.
- [73] Carvalho, F.C.; Martins, D.C.; Santos, A.; Roque-Barreira, M.C.; Bueno, P.R., Evaluating the Equilibrium Association Constant between ArtinM Lectin and Myeloid Leukemia Cells by Impedimetric and Piezoelectric Label Free Approaches. *Biosensors*, **2014**, *4*, (4), 358-369.
- [74] Pei, Z.; Saint-Guirons, J.; Kack, C.; Ingemarsson, B.; Aastrup, T., Real-time analysis of the carbohydrates on cell surfaces using a QCM biosensor: a lectin-based approach. *Biosensors & bioelectronics*, **2012**, *35*, (1), 200-205.
- [75] Li, X.; Song, S.; Shuai, Q.; Pei, Y.; Aastrup, T.; Pei, Y.; Pei, Z., Real-time and label-free analysis of binding thermodynamics of carbohydrate-protein interactions on unfixed cancer cell surfaces using a QCM biosensor. *Scientific reports*, **2015**, *5*, 14066.
- [76] Hu, Y.; Zuo, P.; Ye, B.C., Label-free electrochemical impedance spectroscopy biosensor for direct detection of cancer cells based on the interaction between carbohydrate and lectin. *Biosensors & bioelectronics*, **2013**, *43*, 79-83.
- [77] Peiris, D.; Markiv, A.; Curley, G.P.; Dwek, M.V., A novel approach to determining the affinity of protein-carbohydrate interactions employing adherent cancer cells grown on a biosensor surface. *Biosensors & bioelectronics*, **2012**, *35*, (1), 160-166.
- [78] Bertok, T.; Gemeiner, P.; Mikula, M.; Gemeiner, P.; Tkac, J., Ultrasensitive impedimetric lectin based biosensor for glycoproteins containing sialic acid. *Mikrochimica acta*, **2013**, *180*, (1), 151-159.
- [79] Silva, M.L.; Gutierrez, E.; Rodriguez, J.A.; Gomes, C.; David, L., Construction and validation of a Sambucus nigra biosensor for cancer-associated STn antigen. *Biosensors & bioelectronics*, **2014**, *57*, 254-261.
- [80] Zhang, X.; Teng, Y.; Fu, Y.; Xu, L.; Zhang, S.; He, B.; Wang, C.; Zhang, W., Lectin-based biosensor strategy for electrochemical assay of glycan expression on living cancer cells. *Analytical chemistry*, **2010**, *82*, (22), 9455-9460.
- [81] Li, X.; Pei, Y.; Zhang, R.; Shuai, Q.; Wang, F.; Aastrup, T.; Pei, Z., A suspension-cell biosensor for real-time determination of binding kinetics of protein-carbohydrate interactions on cancer cell surfaces. *Chemical communications (Cambridge, England)*, **2013**, *49*, (85), 9908-9910.
- [82] Yang, H.; Li, Z.; Wei, X.; Huang, R.; Qi, H.; Gao, Q.; Li, C.; Zhang, C., Detection and discrimination of alpha-fetoprotein with a label-free electrochemical impedance spectroscopy biosensor array based on lectin functionalized carbon nanotubes. *Talanta*, **2013**, *111*, 62-68.
- [83] Ghazarian, H.; Idoni, B.; Oppenheimer, S.B., A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta histochemica*, **2011**, *113*, (3), 236-247.
- [84] Minko, T., Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates. *Advanced drug delivery reviews*, **2004**, *56*, (4), 491-509.
- [85] Gabius, H.J., The sugar code in drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, **2004**, *56*, (4), 421-424.
- [86] Pooja, D.; Kulhari, H.; Kuncha, M.; Rachamalla, S.S.; Adams, D.J.; Bansal, V.; Sistla, R., Improving Efficacy, Oral Bioavailability, and Delivery of Paclitaxel Using Protein-Grafted Solid Lipid Nanoparticles. *Molecular pharmaceuticals*, **2016**, *13*, (11), 3903-3912.
- [87] Bulbake, U.; Doppalapudi, S.; Kommineni, N.; Khan, W., Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review. *Pharmaceutics*, **2017**, *9*, (2).
- [88] Li, Y.; Wang, J.; Wientjes, M.G.; Au, J.L., Delivery of nanomedicines to extracellular and intracellular compartments of a solid tumor. *Advanced drug delivery reviews*, **2012**, *64*, (1), 29-39.
- [89] Arnold, A.E.; Czupiel, P.; Shoichet, M., Engineered polymeric nanoparticles to guide the cellular internalization and trafficking of small interfering ribonucleic acids. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, **2017**.
- [90] Dai, Z.; Yue, X., Liposomal nanotechnology for cancer theranostics. *Current medicinal chemistry*, **2017**.
- [91] Rolim-Santos, H.M.L.; Queiroz, F.B.; Maior, R.M.S.; Nascimento, S.C.; Magalhaes, N.S.S., Cytotoxicity of doxorubicin-loaded Con A-liposomes. *Drug Development Research*, **2006**, *67*, (5), 430-437.
- [92] Alagoz, M.; Gilbert, D.C.; El-Khamisy, S.; Chalmers, A.J., DNA repair and resistance to topoisomerase I inhibitors: mechanisms, biomarkers and therapeutic targets. *Current medicinal chemistry*, **2012**, *19*, (23), 3874-3885.
- [93] Du, J.; Lu, W.L.; Ying, X.; Liu, Y.; Du, P.; Tian, W.; Men, Y.; Guo, J.; Zhang, Y.; Li, R.J.; Zhou, J.; Lou, J.N.; Wang, J.C.; Zhang, X.; Zhang, Q., Dual-targeting topotecan liposomes modified with tamoxifen and wheat germ agglutinin significantly improve drug transport across the blood-brain barrier and survival of brain tumor-bearing animals. *Molecular pharmaceuticals*, **2009**, *6*, (3), 905-917.
- [94] Lelle, M.; Freidel, C.; Kaloyanova, S.; Tabujew, I.; Schramm, A.; Musheev, M.; Niehrs, C.; Mullen, K.; Peneva, K., Overcoming drug resistance by cell-penetrating peptide-mediated delivery of a doxorubicin dimer with high DNA-binding affinity. *European journal of medicinal chemistry*, **2017**, *130*, 336-345.
- [95] Das, S.; Tripathi, N.; Preet, R.; Siddharth, S.; Nayak, A.; Bharatam, P.V.; Kundu, C.N., Quinacrine induces apoptosis in cancer cells by forming a functional bridge between

- TRAIL-DR5 complex and modulating the mitochondrial intrinsic cascade. *Oncotarget*, **2017**, *8*, (1), 248-267.
- [96] Li, X.T.; Ju, R.J.; Li, X.Y.; Zeng, F.; Shi, J.F.; Liu, L.; Zhang, C.X.; Sun, M.G.; Lou, J.N.; Lu, W.L., Multifunctional targeting daunorubicin plus quinacrine liposomes, modified by wheat germ agglutinin and tamoxifen, for treating brain glioma and glioma stem cells. *Oncotarget*, **2014**, *5*, (15), 6497-6511.
- [97] Ikemoto, K.; Shimizu, K.; Ohashi, K.; Takeuchi, Y.; Shimizu, M.; Oku, N., Bauhinia purpurea agglutinin-modified liposomes for human prostate cancer treatment. *Cancer science*, **2016**, *107*, (1), 53-59.
- [98] Aldi, S.; Capone, A.; Giovampaola, C.D.; Ermini, L.; Piganigiani, E.; Mariotti, G.; Rosati, F., Identification of a novel, alpha2-fucosylation-dependent uptake system in highly proliferative cells. *Tissue & cell*, **2015**, *47*, (1), 33-38.
- [99] Della Giovampaola, C.; Capone, A.; Ermini, L.; Lupetti, P.; Vannuccini, E.; Finetti, F.; Donnini, S.; Ziche, M.; Magagnani, A.; Leone, G.; Rossi, C.; Rosati, F.; Bonechi, C., Formulation of liposomes functionalized with Lotus lectin and effective in targeting highly proliferative cells. *Biochimica et biophysica acta*, **2017**, *1861*, (4), 860-870.
- [100] Li, X.T.; He, M.L.; Zhou, Z.Y.; Jiang, Y.; Cheng, L., The antitumor activity of PNA modified vinblastine cationic liposomes on Lewis lung tumor cells: *In vitro* and *in vivo* evaluation. *International journal of pharmaceuticals*, **2015**, *487*, (1-2), 223-233.
- [101] Roney, C.A.; Xu, B.; Xie, J.; Yuan, S.; Wierwille, J.; Chen, C.W.; Chen, Y.; Griffiths, G.L.; Summers, R.M., Rh-IEA-1 polymerized liposomes target and image adenomatous polyps in the APC(Min/+) mouse using optical colonography. *Molecular imaging*, **2011**, *10*, (4), 305-316.
- [102] Naseri, N.; Valizadeh, H.; Zakeri-Milani, P., Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application. *Advanced pharmaceutical bulletin*, **2015**, *5*, (3), 305-313.
- [103] Feng, L.; Mumper, R.J., A critical review of lipid-based nanoparticles for taxane delivery. *Cancer letters*, **2013**, *334*, (2), 157-175.
- [104] Yingchoncharoen, P.; Kalinowski, D.S.; Richardson, D.R., Lipid-Based Drug Delivery Systems in Cancer Therapy: What Is Available and What Is Yet to Come. *Pharmacological reviews*, **2016**, *68*, (3), 701-787.
- [105] Lalaleo, L.; Khojasteh, A.; Fattahi, M.; Bonfill, M.; Cusido, R.M.; Palazon, J., Plant Anti-cancer Agents and their Biotechnological Production in Plant Cell Biofactories. *Current medicinal chemistry*, **2016**, *23*, (39), 4418-4441.
- [106] Liu, Y.; Wang, P.; Sun, C.; Zhao, J.; Du, Y.; Shi, F.; Feng, N., Bioadhesion and enhanced bioavailability by wheat germ agglutinin-grafted lipid nanoparticles for oral delivery of poorly water-soluble drug bufalin. *International journal of pharmaceuticals*, **2011**, *419*, (1-2), 260-265.
- [107] Liu, Y.; Zhao, Y.; Liu, J.; Zhang, M.; Yu, M.; Feng, N., Wheat germ agglutinin modification of lipid-polymer hybrid nanoparticles: enhanced cellular uptake and bioadhesion. *RSC Advances*, **2016**, *6*, (42), 11.
- [108] Danhier, F.; Ansorena, E.; Silva, J.M.; Coco, R.; Le Breton, A.; Preat, V., PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, **2012**, *161*, (2), 505-522.
- [109] Sadat Tabatabaei Mirakabad, F.; Nejati-Koshki, K.; Akbarzadeh, A.; Yamchi, M.R.; Milani, M.; Zarghami, N.; Zeighamian, V.; Rahimzadeh, A.; Alimohammadi, S.; Hanifehpour, Y.; Joo, S.W., PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, **2014**, *15*, (2), 517-535.
- [110] Ramezani, M.; Ebrahimian, M.; Hashemi, M., Current strategies in modification of PLGA-based gene delivery system. *Current medicinal chemistry*, **2016**.
- [111] Yin, Y.; Chen, D.; Qiao, M.; Wei, X.; Hu, H., Lectin-conjugated PLGA nanoparticles loaded with thymopentin: ex vivo bioadhesion and *in vivo* biodistribution. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, **2007**, *123*, (1), 27-38.
- [112] Yin, Y.; Chen, D.; Qiao, M.; Lu, Z.; Hu, H., Preparation and evaluation of lectin-conjugated PLGA nanoparticles for oral delivery of thymopentin. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, **2006**, *116*, (3), 337-345.
- [113] Wang, C.; Ho, P.C.; Lim, L.Y., Wheat germ agglutinin-conjugated PLGA nanoparticles for enhanced intracellular delivery of paclitaxel to colon cancer cells. *International journal of pharmaceuticals*, **2010**, *400*, (1-2), 201-210.
- [114] Mo, Y.; Lim, L.Y., Preparation and *in vitro* anticancer activity of wheat germ agglutinin (WGA)-conjugated PLGA nanoparticles loaded with paclitaxel and isopropyl myristate. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, **2005**, *107*, (1), 30-42.
- [115] Neusch, L.; Wirth, E.M.; Spijker, S.; Pichl, C.; Kahlig, H.; Gabor, F.; Wirth, M., Synergistic targeting/prodrug strategies for intravesical drug delivery-lectin-modified PLGA microparticles enhance cytotoxicity of stearyl gemcitabine by contact-dependent transfer. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, **2013**, *169*, (1-2), 62-72.
- [116] Neusch, L.; Wambacher, M.; Wirth, E.M.; Spijker, S.; Kahlig, H.; Wirth, M.; Gabor, F., UPEC biomimicry at the urothelial barrier: lectin-functionalized PLGA microparticles for improved intravesical chemotherapy. *International journal of pharmaceuticals*, **2013**, *450*, (1-2), 163-176.
- [117] Chen, J.; Zhang, C.; Liu, Q.; Shao, X.; Feng, C.; Shen, Y.; Zhang, Q.; Jiang, X., Solanum tuberosum lectin-conjugated PLGA nanoparticles for nose-to-brain delivery: *in vivo* and *in vitro* evaluations. *Journal of drug targeting*, **2012**, *20*, (2), 174-184.
- [118] Shao, X.; Liu, Q.; Zhang, C.; Zheng, X.; Chen, J.; Zha, Y.; Qian, Y.; Zhang, X.; Zhang, Q.; Jiang, X., Concanavalin A-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(lactic acid) nanoparticles for intranasal drug delivery to the cervical lymph nodes. *Journal of microencapsulation*, **2013**, *30*, (8), 780-786.
- [119] Gao, X.; Tao, W.; Lu, W.; Zhang, Q.; Zhang, Y.; Jiang, X.; Fu, S., Lectin-conjugated PEG-PLA nanoparticles: preparation and brain delivery after intranasal administration. *Biomaterials*, **2006**, *27*, (18), 3482-3490.
- [120] Gao, X.; Chen, J.; Tao, W.; Zhu, J.; Zhang, Q.; Chen, H.; Jiang, X., UEA I-bearing nanoparticles for brain delivery following intranasal administration. *International journal of pharmaceuticals*, **2007**, *340*, (1-2), 207-215.
- [121] Gao, X.; Wu, B.; Zhang, Q.; Chen, J.; Zhu, J.; Zhang, W.; Rong, Z.; Chen, H.; Jiang, X., Brain delivery of vasoactive intestinal peptide enhanced with the nanoparticles conjugated with wheat germ agglutinin following intranasal administration. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, **2007**, *121*, (3), 156-167.
- [122] Oliveira, A.S.; Sousa, E.; Vasconcelos, M.H.; Pinto, M., Curcumin: A Natural Lead for Potential New Drug Candidates. *Current medicinal chemistry*, **2015**, *22*, (36), 4196-4232.
- [123] Kangarlou, S.; Ramezanzpour, S.; Balalaie, S.; Roudbar Mohammadi, S.; Haririan, I., Curcumin-loaded nanoliposomes linked to homing peptides for integrin targeting and neuropilin-1-mediated internalization. *Pharmaceutical biology*, **2017**, *55*, (1), 277-285.

- [124] Kilicay, E.; Karahaliloglu, Z.; Hazer, B.; Tekin, I.O.; Denkbass, E.B., Concanavaline A conjugated bacterial polyester-based PHBHHx nanoparticles loaded with curcumin for breast cancer therapy. *Journal of microencapsulation*, **2016**, *33*, (3), 274-285.
- [125] Liu, Z.; Luo, Y.; Zhou, T.T.; Zhang, W.Z., Could plant lectins become promising anti-tumour drugs for causing autophagic cell death? *Cell proliferation*, **2013**, *46*, (5), 509-515.
- [126] Fu, L.L.; Zhou, C.C.; Yao, S.; Yu, J.Y.; Liu, B.; Bao, J.K., Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **2011**, *43*, (10), 1442-1449.
- [127] Liu, B.; Bian, H.J.; Bao, J.K., Plant lectins: potential anti-neoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer letters*, **2010**, *287*, (1), 1-12.
- [128] Liu, Z.; Zhang, Q.; Peng, H.; Zhang, W.Z., Animal lectins: potential antitumor therapeutic targets in apoptosis. *Applied biochemistry and biotechnology*, **2012**, *168*, (3), 629-637.
- [129] Yau, T.; Dan, X.; Ng, C.C.; Ng, T.B., Lectins with potential for anti-cancer therapy. *Molecules (Basel, Switzerland)*, **2015**, *20*, (3), 3791-3810.
- [130] Dan, X.L.; Ng, T.B., Lectins in human cancer: both a devil and an angel? *Current protein & peptide science*, **2013**, *14*, (6), 481-491.
- [131] Singh, R.S.; Kaur, H.P.; Kanwar, J.R., Mushroom Lectins as Promising Anticancer Substances. *Current protein & peptide science*, **2016**, *17*, (8), 797-807.
- [132] Andrade, C.A.; Correia, M.T.; Coelho, L.C.; Nascimento, S.C.; Santos-Magalhaes, N.S., Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. *International journal of pharmaceuticals*, **2004**, *278*, (2), 435-445.
- [133] Beltrao, E.I.; Correia, M.T.; Figueredo-Silva, J.; Coelho, L.C., Binding evaluation of Isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Applied biochemistry and biotechnology*, **1998**, *74*, (3), 125-134.
- [134] da Cunha, C.R.; da Silva, L.C.; Almeida, F.J.; Ferraz, M.S.; Varejao, N.; Cartaxo, M.F.; de Miranda, R.C.; de Aguiar, F.C., Jr.; Santos, N.P.; Coelho, L.C.; Santos-Magalhaes, N.S.; Correia, M.T., Encapsulation into Stealth Liposomes Enhances the Antitumor Action of Recombinant *Cratylia mollis* Lectin Expressed in *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology*, **2016**, *7*, 1355.
- [135] Lyu, S.Y.; Park, W.B.; Choi, K.H.; Kim, W.H., Involvement of caspase-3 in apoptosis induced by *Viscum album* var. *coloratum* agglutinin in HL-60 cells. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, **2001**, *65*, (3), 534-541.
- [136] Han, S.Y.; Hong, C.E.; Kim, H.G.; Lyu, S.Y., Anti-cancer effects of enteric-coated polymers containing mistletoe lectin in murine melanoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Molecular and cellular biochemistry*, **2015**, *408*, (1-2), 73-87.
- [137] Lyu, S.Y.; Choi, S.H.; Park, W.B., Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in hepatocarcinoma cells is associated with inhibition of telomerase *via* mitochondrial controlled pathway independent of p53. *Archives of pharmacological research*, **2002**, *25*, (1), 93-101.
- [138] Park, W.B.; Lyu, S.Y.; Kim, J.H.; Choi, S.H.; Chung, H.K.; Ahn, S.H.; Hong, S.Y.; Yoon, T.J.; Choi, M.J., Inhibition of tumor growth and metastasis by Korean mistletoe lectin is associated with apoptosis and antiangiogenesis. *Cancer biotechnology & radiopharmaceuticals*, **2001**, *16*, (5), 439-447.
- [139] Hong, C.E.; Park, A.K.; Lyu, S.Y., Synergistic anticancer effects of lectin and doxorubicin in breast cancer cells. *Molecular and cellular biochemistry*, **2014**, *394*, (1-2), 225-235.
- [140] Lyu, S.Y.; Kwon, Y.J.; Joo, H.J.; Park, W.B., Preparation of alginate/chitosan microcapsules and enteric coated granules of mistletoe lectin. *Archives of pharmacological research*, **2004**, *27*, (1), 118-126.
- [141] Kabir, S.R.; Nabi, M.M.; Haque, A.; Rokon Uz, Z.; Mahmud, Z.H.; Reza, M.A., Pea lectin inhibits growth of Ehrlich ascites carcinoma cells by inducing apoptosis and G2/M cell cycle arrest *in vivo* in mice. *Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, **2013**, *20*, (14), 1288-1296.
- [142] El-Aassar, M.R.; Hafez, E.E.; El-Deeb, N.M.; Fouda, M.M., Microencapsulation of lectin anti-cancer agent and controlled release by alginate beads, biosafety approach. *International journal of biological macromolecules*, **2014**, *69*, 88-94.

DISCLAIMER: The above article has been published in Epub (ahead of print) on the basis of the materials provided by the author. The Editorial Department reserves the right to make minor modifications for further improvement of the manuscript.

PMID: 28545372

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

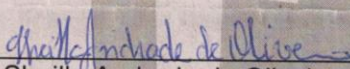
Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado: **Prospecção de novas drogas contra leishmaniose: Estudo da atividade de lectinas sobre *Leishmania sp.*** protocolado sob nº 77/2014 pelo (a) pesquisador (a) Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo. Está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 21/08/2015. **Este projeto está aprovado e terá licença emitida após regularização desta CEUA junto ao CONCEA.**

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
Camundongo Balb/c machos	820

We certify that project entitled **Prospecção de novas drogas contra leishmaniose: Estudo da atividade de lectinas sobre *Leishmania sp.*** Protocol nº 77/2014, coordinated by Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo. Is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz on August, 21, 2015. **This project has been approved and its license will be issued upon regularization of this CEUA by the CONCEA.**

Recife (PE, Brazil) August, 21, 2015.


 Dr^a Sheilla Andrade de Oliveira
 Coordenadora CEUA/CPqAM

Dr^a Sheilla Andrade de Oliveira
 Coordenadora da Comissão de Ética
 no Uso de Animais – CEUA
 Mat. SIAPE 1554975
 e-mail: sheilla@cpqam.fiocruz.br
 CPqAM/Fiocruz