

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

PALLOMA PORTO ALMEIDA

**IDENTIFICAÇÃO DOS LIGANTES DA LECTINA BOL E SEU ENVOLVIMENTO NA
SINALIZAÇÃO CELULAR**

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2020**

PALLOMA PORTO ALMEIDA

**IDENTIFICAÇÃO DOS LIGANTES DA LECTINA BOL E SEU ENVOLVIMENTO NA
SINALIZAÇÃO CELULAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Leandro Licursi de Oliveira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A447i
2020
Almeida, Palloma Porto, 1994-
Identificação dos ligantes da lectina BOL e seu
envolvimento na sinalização celular / Palloma Porto Almeida. –
Viçosa, MG, 2020.
56 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Leandro Licursi de Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.48-56.

1. Lectinas. 2. Domínios proteicos. 3. Transdução de sinal
celular. 4. Imunologia. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Biologia Geral. Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 572.6

PALLOMA PORTO ALMEIDA

**IDENTIFICAÇÃO DOS LIGANTES DA LECTINA BOL E SEU
ENVOLVIMENTO NA SINALIZAÇÃO CELULAR**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 14 de fevereiro de 2020

Assentimento:



Palloma Porto Almeida
Autora



Leandro Licursi de Oliveira
Orientador

*Dedico esse trabalho a todas as mulheres que vieram
antes de mim e conquistaram o meu direito de poder
fazê-lo.*

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Gratidão é um dos mais sinceros sentimentos que o ser humano pode ter. E hoje, em mais um ciclo que se fecha, continuo uma pessoa grata. Sou grata à minha família pelo apoio, sabedoria e conselhos. Obrigada à minha avó, Alzira Pereira de Almeida, por ser meu porto seguro. À minha mãe, Benilene Pereira de Almeida, por todo apoio de sempre. Obrigada a minha tia, Benilde Pereira de Almeida, pela confiança e suporte. Vocês são minha base e sem vocês eu jamais chegaria onde eu cheguei.

Aos meus amigos que fizeram eu construir morada em Viçosa. Obrigada Danu, Leonel, Luiz e Marina, por serem minha família longe de casa, pelas experiências e pela amizade de vocês, vocês mudaram profundamente a minha forma de ver o mundo. Ao Guilherme, pelos vários cafés e incríveis discussões que tivemos ao longo desse tempo. À minha amiga Mayara, pela nossa dupla probleminha, fiel ao desbravamento de Viçosa comigo. À Marina Miranda, por todo amor e companheirismo, obrigada pelo apoio ao longo do caminho que percorri para chegar até aqui. À Daniela Grijó, por compartilhar comigo sua leveza e energia, e também seus conselhos. À Jéssica, por ser brisa leve em tempos de vendaval. À Nadja, pela amizade sincera e pelas risadas. À Iara, pela loucura e afeto compartilhados. E ao John, por todas as nossas conversas igualmente produtivas e aleatórias. Obrigada por estarem ao meu lado nos momentos mais loucos, nos mais felizes, e também nos mais difíceis. Obrigada pela oportunidade de aprender com vocês o que a vida tem de melhor para oferecer.

Não posso deixar de agradecer a Viçosa, meu lar, refúgio e muitas vezes meu caos. Obrigada por toda a experiência e juízo que você me trouxe, ou levou, e pelas

peessoas maravilhosas que colocou no meu caminho. Minha passagem foi breve,
mas suficiente para me enriquecer de ótimas lembranças.

AGRADECIMENTOS PROFISSIONAIS

Ao meu orientador Professor Dr. Leandro Licursi de Oliveira, por ter me acolhido em seu laboratório, tanto na Mobilidade Acadêmica quanto como discente do Programa de Pós-Graduação, contribuindo significativamente no desenvolvimento desse trabalho e além de ter sido um exemplo de multidisciplinaridade ao longo desse tempo.

Ao Professor Dr. Sérgio Oliveira de Paula e seus orientandos, pela colaboração no uso dos equipamentos e do espaço de trabalho.

Aos meus colegas do Laboratório de Imunoquímica e Glicobiologia, Amanda, Gabriela, Camilla, Leonardo e Alessandra pela ajuda na execução do meu trabalho, pelos cafés, convivências e boas risadas. Ao Jorge, por todo suporte técnico e apoio.

Ao Departamento de Biologia Geral, pela oportunidade de obter minha formação acadêmica.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa, e ao Núcleo de Análise de Biomoléculas da Universidade Federal de Viçosa, na pessoa do Edvaldo Barros.

À Universidade Federal de Viçosa, por todo suporte durante esse período.

Aos membros da banca, pelas valiosas contribuições.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)/CBB – APQ – 0146317.

“Não explicar a ciência me parece perverso. Quando você está apaixonado, você quer contar isso para o mundo”.

(Carl Sagan)

RESUMO

ALMEIDA, Palloma Porto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2020. **Identificação dos Ligantes da Lectina BOL e Seu Envolvimento na Sinalização Celular.** Orientador: Leandro Licursi De Oliveira.

A BOL é uma proteína do tipo TRAF com atividade de lectina, extraída de *Brassica oleracea* ssp. *botrytis*. Trabalhos anteriores identificaram a capacidade da BOL de induzir fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos. O objetivo deste estudo foi analisar a capacidade de ligação da BOL à superfície de leucócitos e a identificação dos seus possíveis ligantes. Demonstramos pela primeira vez que a BOL é capaz de ligar a superfície de linfócitos e macrófagos; capacidade esta que pode estar relacionada aos efeitos observados em macrófagos. Ainda, através do ensaio de MTT foi possível observar que a BOL é capaz de induzir proliferação em esplenócitos, sendo a concentração mínima de 1,25 µg/mL suficiente para indução. Através da cromatografia de afinidade por lectina, com uma resina acoplada com BOL, foi possível purificar 4 possíveis ligantes dessa lectina. O sequenciamento proteico por MALDI/TOF revelou quatro potenciais ligantes, TF3C2, NEST, ELNF1 e FERL3. Análises *in silico* predisseram os possíveis sítios de glicosilação dessas proteínas e acessibilidade de resíduos na superfície proteica, indicando que as proteínas possuem sítios de glicosilação acessíveis na sua superfície, confirmando a possibilidade desses possíveis ligantes serem glicoproteínas. Essas proteínas estão envolvidas em diferentes níveis com a sinalização celular, proliferação e citoesqueleto, desse modo, a interação da lectina BOL, contendo uma estrutura com apenas dois domínios MATH, pode indicar a possível atuação desse domínio como um CRD e o de lectinas em eventos de sinalização celular.

Palavras-chave: Lectina. Domínios proteicos. Sinalização. Imunologia.

ABSTRACT

ALMEIDA, Palloma Porto, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2020. **Identification of BOL lectin ligands and its role in cell signaling.** Adviser: Leandro Licursi De Oliveira.

BOL is a TRAF-protein with lectinic activity extracted from *Brassica oleracea* ssp. *Botrytis*. Previous work has identified BOL's ability to induce phagocytosis, production of reactive oxygen species in macrophages. The aim of this study was to analyze the capacity of BOL to bind to the leukocyte surface and to identify its possible ligands. We demonstrated for the first time that BOL is capable of binding the surface of lymphocytes and macrophages; capacity which may be related to the effects observed in macrophages. Through the MTT assay it was possible to observe that BOL is capable of inducing proliferation in splenocytes, with a minimum concentration of 1.25 µg/mL sufficient for induction. Through lectin affinity chromatography, with a BOL-coupled resin, it was possible to purify 4 possible ligands of this lectin. Protein sequencing by MALDI/TOF revealed four potential ligands, TF3C2, NEST, ELNF1, and FERL3. *In silico* analyzes predicted the possible glycosylation sites of these proteins and accessibility of residues on the protein surface, indicating that the proteins have accessible glycosylation sites on their surface, confirming the possibility of these possible ligands being glycoproteins. These proteins are involved at different levels with cell signaling, proliferation and cytoskeleton organization, so the interaction of lectin BOL, containing a structure with only two MATH domains, may indicate the possible role of this domain as a CRD and the role of lectins in cell signaling events.

Keywords: Lectin. Protein domains. Signaling. Lymphocytes

LISTA DE ABREVIATURAS

Asn	Asparagina
BOL	Lectina do tipo TRAF nativa de <i>Brassica oleracea</i> ssp. <i>Botrytis</i>
BTB/POZ	Brick-a-brac Tramtrack-Broad/pox virus and zinc finger
CRD	Domínio de reconhecimento de carboidratos
ConA	Concanavalina A
ELFN1	Proteína 1 Extracelular Rica em Repetições de Leucina Contendo o Domínio Tipo III
FER3L	Proteína tipo Fer3
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GTF3C1	vide TF3C2
MATH	Mepirin and TRAF Homology
MALDI	Ionização por dessorção de matriz assistida por laser
MTT	Brometo de 3- (4,5-dimetil-tiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
NEST	Nestina
PHA	Fitohemaglutinina
rBOL	BOL recombinante
rBOL-Ni	Coluna de cromatografia de afinidade por BOL
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio
Ser	Serina
TCR	Receptor de células T
TF3C2	Fator de Transcrição Geral 3C polipeptídio 2
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
TRAF	TNF receptor-associated factor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Lectinas	13
1.1.1 Considerações iniciais.....	13
1.1.2 Breve histórico.....	13
1.1.3 Classificação e função.....	14
1.2 Sinalização celular	16
1.3 Glicanos	17
1.4 Domínios proteicos.....	17
1.4.1 Domínio MATH.....	18
1.5 Lectinas e o sistema imunológico.....	19
1.6 Lectina do tipo TRAF – BOL.....	20
2 OBJETIVOS22	
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 Declaração de Ética	23
3.2 Animais.....	23
3.3 Lectinas	23
3.4 Obtenção das células	23
3.5 Citometria de fluxo	24
3.6 Ensaio de Proliferação Celular	24
3.7 Cromatografia de Afinidade por lectina	24
3.7.1 Preparação da resina de afinidade de lectina	24
3.7.2 Procedimento de cromatografia de afinidade baseado em rBOL	25
3.8 Eletroforese das proteínas purificadas em cromatografia de afinidade por lectina	25
3.9 Western Blot.....	26

3.10 Sequenciamento proteico dos ligantes obtidos por coluna de afinidade de lectina	26
3.10.1 Digestão Trípica	26
3.10.2 Dessalinização e Concentração de Peptídeos	27
3.10.3 Espectrometria de massas	27
3.10.4 Pesquisa no banco de dados	27
3.11 Determinação da glicosilação de proteínas e acessibilidade da superfície	28
4 RESULTADOS	29
4.1 BOL é capaz de se ligar à superfície celular de linfócitos e monócitos de maneira dose-dependente	29
4.2 BOL é capaz de induzir proliferação de linfócitos.....	30
4.3 Identificação de possíveis ligantes de BOL por cromatografia de afinidade.....	31
4.4 BOL apresenta 4 potenciais ligantes em leucócitos	33
4.5 Os potenciais ligantes de BOL possuem sítios de N- e O-glicosilação acessíveis na superfície proteica	37
5 DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lectinas

1.1.1 Considerações iniciais

Proteínas são biopolímeros com a habilidade de combinar-se de forma flexível à uma impressionável variedade de biomoléculas. Lectinas representam uma classe desses biopolímeros com capacidade de reconhecer carboidratos e glicoconjugados de maneira reversível e altamente específica, sem, contudo, realizar atividade catalítica (SHARON, 2004^a; DE SCHUTTER; VAN DAMME, 2015). Inicialmente, as lectinas foram identificadas como proteínas derivadas de plantas, devido sua abundância em sementes de leguminosas. Mais tarde, foi demonstrado que são amplamente distribuídas na natureza, presentes em bactérias, vírus, fungos, e animais (BASHEER; IMBERTY, 2013; MASON; TARR, 2015; NIZET; VARKI; AEBI, 2017; VARROT).

Curiosamente, somente após a década de 1960, as lectinas passaram a chamar atenção no ramo da pesquisa aplicada e atualmente, também na área biotecnológica. Essa mudança se deu após a evidenciação de que uma lectina isolada de sementes de *Phaseolus vulgaris*, nomeada fitohemaglutinina (PHA), estimulava linfócitos a entrar em mitose (NOWELL, 1960b); e que modificações de padrões de glicosilação da superfície celular estavam relacionadas a patologias (SHARON, 2004b) e, por isso, podiam ser diferencialmente reconhecidas por lectinas específicas (AUB; SANFORD; COTE, 1965). A partir disso, atividades biológicas como anti-inflamatória, antinociceptiva, antiviral e imunomoduladora foram investigadas em lectinas (HOLANDA *et al.*, 2009; OOI *et al.*, 2010; PINTO *et al.*, 2013; CAMPOS *et al.*, 2016; MITCHELL; RAMESSAR; O'KEEFE, 2017), bem como a análise de seus glico-alvos específicos e vias de sinalização aos quais estão envolvidas.

1.1.2 Breve histórico

O primeiro relato dessa classe de proteínas ocorreu em 1853, através da

observação por Charcot e Robin de estruturas cristalinas em lâminas de tecido patológico, nomeados cristais de Charcot-Leyden, e posteriormente elucidados como cristais proteicos puros de uma lectina denominada galectina-10 (ACKERMAN *et al.*, 1993; KILPATRICK, 2002). Somente em 1860, Silas Weir Mitchel descreveu pela primeira vez a habilidade de lectinas de aglutinar eritrócitos, observação provinda de seus estudos com veneno de serpente *Crotalus durissus* e sua ação em hemácias de pombo (MITCHELL, 1860).

A atividade lectínica em vegetais foi reportada 18 anos depois por Peter Stillmark, em sua tese de doutorado na Universidade de Dorpat. Ao estudar o sementes de mamona (*Ricinus communis*), Stillmark observou uma fração tóxica e aglutinante, a qual atribuiu a denominação de *ricina* (FRANZ, 1988). Três anos mais tarde, uma lectina foi descrita presente no extrato de sementes de feijão de *Abrus precatorius*, denominada *Abrin* (HELLIN, 1891). Essa proteína foi fundamental para Paul Erlich em sua investigação dos princípios básicos da imunologia, estabelecendo as lectinas como modelos antigênicos viáveis em substituição às toxinas bacterianas (EHRlich, 1900).

O termo lectina só veio a ser cunhado por Boyd e Shapleigh em 1954, originado do latim “lectus” para “escolher” ou “selecionar” (BOYD; SHAPLEIGH, 1954). Anterior a isso, o termo hemaglutinina ou fitohemaglutinina, do alemão *Blutkörperchenagglutinina*, era empregado ao se referir a esse grupo de proteínas capazes de causar aglutinação celular (SHARON; LIS, 1989).

1.1.3 Classificação e função

As lectinas são compreendidas em grupo heterógeno de proteínas, diferenciando-se entre si em relação a sua estrutura, evolução, propriedades físico-químicas e atividades biológicas (VAN DAMME *et al.*, 1998; RÜDIGER; GABIUS, 2001). Para serem classificadas como lectinas, foi proposto que as proteínas candidatas preenchessem três pré-requisitos: (i) serem de origem não imune, (ii) com no mínimo um domínio não catalítico que (iii) se liga reversivelmente a mono ou oligossacarídeos de maneira específica através do seu domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) (GOLDSTEIN *et al.*, 1980; PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Apesar de laboriosa definição, as lectinas classificam-se majoritariamente com base na sua estrutura molecular. Os CRDs de cada lectina são agrupados em múltiplas famílias de proteínas evolutivamente e bioquimicamente relacionadas, dispondo do compartilhamento de um padrão de resíduos aminoacídicos conservados e invariáveis. As lectinas são agrupadas em famílias a partir de seus domínios, como tipo C, S ou P, e seus respectivos subgrupos (KISHORE; EGGLETON; REID, 1997; LORIS, 2002; FUJIMOTO; TATENO; HIRABAYASHI, 2014).

A localização e a estrutura dessas lectinas relacionam-se com a função exercida pelas mesmas. Em plantas, as lectinas são predominantemente encontradas em sementes de leguminosas, onde exercem ação fundamental na maturação e manutenção da dormência (HOWARD; SAGE; HORTON, 1972; PEUMANS WILLY J.; STINISSEN, 1983), como estimuladores mitogênicos das células embrionárias vegetais (HOWARD; SAGE; HORTON, 1972), e na fixação de N₂ para desenvolvimento de embriões (DÍAZ *et al.*, 1995; PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Relativo à estrutura, lectinas tipo C, proteínas que se ligam ao cálcio e a carboidratos através do mesmo sítio de ligação (EWART; JOHNSON; ROSS, 1999), encontram-se secretadas no meio extracelular e em fluidos biológicos, desempenhando funções como adesão celular, sinalização celular, e reconhecimento de patógenos (GUPTA, 2012).

As lectinas do tipo S, também conhecidas como galectinas, podem ser encontradas no citoplasma ou meio extracelularmente. Reconhecem predominantemente glicoconjugados contendo β -galactosil de uma forma não dependente de cátions divalentes (LEFFLER *et al.*, 2002; VARKI *et al.*, 1999). As galectinas podem promover interações célula-células relacionadas com a sinalização celular na indução de apoptose (PERILLO *et al.*, 1995; WADA *et al.*, 1997; YANG; HSU; LIU, 1996), e também mudanças metabólicas como ativação, diferenciação e proliferação celular (COLNOT *et al.*, 1998; NANGIA-MAKKER *et al.*, 2000; SONG *et al.*, 2012). Desse modo, estrutura e localização endógena de lectinas são duas variáveis de grande importância ao se discutir a função que essas exercem.

1.2 Sinalização celular

A sinalização celular é um conjunto de processos relacionados a manutenção do estado fisiológico da célula frente a sua interação com o ambiente extracelular. Essa manutenção da homeostase e sobrevivência celular ocorre através do reconhecimento de sinais por receptores de membrana. A membrana celular é a estrutura responsável não só por delimitar o espaço intracelular, ou citoplasma, mas também é o meio de comunicação, interação e reconhecimento entre a célula e o meio extracelular e/ou célula-célula (BRANTON; DEAMER, 1972; BELL, 1978; LANCTOT; GAGE; VARKI, 2007; LEMMON, 2008; ARMSTRONG; PERRIMAN, 2016;). É uma estrutura equipada de proteínas transmembranas, como receptores, poros e canais, glicocálice, sinalizadores e proteínas de adesão (LANCTOT; GAGE; VARKI, 2007; ALBERTS *et al.*, 2014). A sobrevivência celular é um exemplo de atividade biológica intrinsecamente controlada pela membrana das células, uma vez que a presença de interação e fixação à matriz extracelular mediante adesão celular adequada é um sinal de sobrevivência que inibe vias apoptóticas, prevenindo que a celular sofra *anoikis*, um tipo de apoptose induzida por perda de contato e readesão a matrizes novas (FRISCH, 1994; FRISCH; RUOSLAHTI, 1997).

O processo de sinalização frequentemente é deflagrado a partir de sinais bioquímicos reconhecidos pela célula a partir de receptores e/ou sensores em sua membrana. Esses sinais são transduzidos, ou seja, transferidos ao longo de vias de sinalização, e culminam em resposta celular (CASEY, 1995; HUBBARD; ROTHLEIN, 2000; SCHLESSINGER, 2000). As células dispõem de uma vasta diversidade desses receptores e/ou proteínas sinalizadoras embebidos na bicamada lipídica da membrana plasmática; sendo que o reconhecimento do sinal envolve interações físico-químicas entre as proteínas de membrana e a molécula sinalizadora. A interação entre esses fatores só é permitida diante da disponibilidade estrutural dos mesmos, o que permite que eles se reconheçam e deflagrem alterações conformacionais e transmitam esse sinal a diante. As proteínas são os atores principais na homeostase e sinalização celular. Dispõem de sítios para alterações pós-traducionais como fosforilação e glicosilação que permitem a indução/inibição de sua atividade bioquímica. Estruturalmente, seu enovelamento permite a formação de regiões da estrutura de uma proteína relacionadas com a sua função, como domínios

(AKIVA *et al.*, 2012).

1.3 Glicanos

O sistema de sinalização por glicanos é diverso, envolvendo desde açúcares simples como glicose ou frutose, até glicoconjugados, como glicoproteínas ou glicolípídios (BUMAH *et al.*, 2015). Os glicanos são encontrados na superfície de células e na matriz extracelular, bem como no ambiente intracelular, estando presente no retículo endoplasmático, núcleo, Golgi, e outras organelas (ZHAO *et al.*, 2008). A superfície celular é coberta de uma cama de glicanos denominada glicocálice. Esses glicoconjugados presentes imersos na membrana celular estão relacionados com a identidade, sinalização e adesão de células, como por exemplo as selectinas -P e -E e as integrinas (TARBELL; SIMON; CURRY, 2014). Entretanto, glicanos não são importantes apenas extracelularmente ou nas membranas celulares.

A glicosilação é a modificação pós-traducional mais comum em proteínas e está envolvida em funções intracelulares essenciais, incluindo transdução de sinais (TANIGUCHI *et al.*, 2006; VARKI, 1993; DWEK, 1995). Consiste em uma modificação enzimática com a adição de carboidratos à resíduos de aminoácidos específicos. Cerca de 13 diferentes monossacarídeos e 8 aminoácidos estão envolvidos nas ligações que ocorrem durante a glicosilação (SPIRO, 2002). Os tipos mais comuns de glicosilação são as adições de carboidratos aos resíduos de Asparagina e Serina ou Treonina. A adição de um monossacarídeo ao um resíduo de asparagina é denominada de N-glicosilação, e ocorre na sequência consenso Asn-X-Ser, onde X é qualquer aminoácido exceto Prolina. Já a adição de carboidratos à Serina ou Treonina é denominada O-glicosilação, sem uma sequência consenso específica (KORNFELD; KORNFELD, 1985).

1.4 Domínios proteicos

Domínios proteicos são subunidades estruturais de uma proteína e podem ser classificados em domínios funcionais ou estruturais (FINN *et al.*, 2014). Muitas proteínas apresentam mais de um domínio, podendo ocorrer uma associação entre os mesmos levando ao surgimento de domínios desempenhando novas funções

(JONES; THORNTON, 1996). Isso permite que proteínas não relacionadas apresentem semelhança funcional entre seus domínios. Ao se comparar proteínas pela sua sequência, os domínios são analisados de uma perspectiva evolutiva onde são classificados como homólogos, quando similares em sequência, independente do contexto molecular (PONTING; RUSSELL, 2002). Entretanto, a similaridade estrutural muitas vezes não se reflete em funções similares, uma vez que diferentes famílias de domínios contém representantes frequentemente com funções distintas entre si (PONTING; RUSSELL, 2002).

1.4.1 Domínio MATH

Os domínios MATH (do inglês, *Meprin and TRAF homology*) são domínios compartilhados pelas proteínas TRAF (TNF receptor-associated factor), com exceção da TRAF7, presentes na sua região C-terminal, com a habilidade de interagir diretamente com receptores ou proteínas adaptadoras (YIN *et al.*, 2010). Estão presentes nos eucariotos de forma geral, sendo homólogos às meprinas, endopeptidases tecido-específicas, compartilhando uma região conservada de 180 resíduos, sem função similar descrita. (SUNNERHAGEN; PURSGLOVE; FLADVAD, 2002). Já foram descritos em planta, onde em *Prunus armeniaca* foi identificado um grupo de proteínas contendo domínios MATH em um loco de resistência ao vírus *Plum pox* (ZURIAGA *et al.*, 2013). Similarmente, o gene *RTM3*, de *Arabidopsis*, codifica uma proteína com domínio MATH em sua estrutura, relacionada com a resistência ao *potyvirus* (COSSON *et al.*, 2010).

O domínio TRAF C-terminal (MATH) pode ser dividido em TRAF-N e TRAF-C, este último adota uma topologia única de folhas β compostas por oito fitas β , numa conformação tridimensional similar à observada em meprinas (YIN *et al.*, 2010), sendo também conhecido como domínio TRAF/MATH. Em proteínas TRAF é responsável pela sua associação com moléculas adaptadoras, como a TRADD (Proteína de Domínio de Morte Associada a Receptor de TNF) (PARK *et al.*, 2000).

O domínio TRAF/MATH também já foi reportado presente na região N-terminal, em outras proteínas, como a protease ubiquitina-específica 7 (USP7), onde também compreende uma conformação de sanduíche de folhas β antiparalelas composto por 8 fitas β (FAESEN; SIXMA; EVERETT, 2013), sendo descrito como responsável pelo

recrutamento de p53 e HDM2 (HOLOWATY *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2002). Em geral, está presente em proteínas associado com outros domínios proteicos, incluindo peptidases, domínios BTB/POZ ((brick-a-brac tramtrack-broad/pox vírus and zinc finger), domínios Dedo de Zinco e TRIM37 (ZAPATA; MARTÍNEZ-GARCÍA; LEFEBVRE, 2007).

Desse modo, é evidente que o domínio MATH apresenta diversas funções em eucariotos, estando associado ou não a outros domínios proteicos (ZAPATA; MARTÍNEZ-GARCÍA; LEFEBVRE, 2007). Diante dessa diversidade funcional do MATH, sua participação em outros processos de sinalização celular e interações com diferentes proteínas ainda podem vir a ser elucidados.

1.5 Lectinas e o sistema imunológico

A capacidade de lectinas interagirem com células do sistema imune e induzirem alterações metabólicas ou atividades biológicas já foi reportado na literatura. Lectinas podem atuar como agentes mitôgenicos, sendo bem descrita sua ação estimulante na proliferação de linfócitos (BLASCO *et al.*, 1995). A proliferação celular é um fator essencial para a manutenção das diferentes respostas imunes adaptativas (SUN *et al.*, 2016). ConA e PHA são lectinas descritas como indutoras de proliferação (NOWELL, 1960a; WECKSLER; LEVY; JAFFÉ, 1968), sendo a sua ação mitogênica descrita pela ligação destas ao receptor de células T (TCR) na superfície de linfócitos, culminando na ativação da via de sinalização das MAPK e consequente proliferação celular (BLASCO *et al.*, 1995; CARVALHO *et al.*, 2018). Ainda, os alvos de lectinas nessas células parecem estar relacionados não apenas à proliferação, mas também à ativação e ao aumento da resposta imune (DA SILVA *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2017). Processos como a síntese de citocinas estão envolvidos em uma variedade de eventos imunológicos e podem ser estimulados por lectinas. O perfil Th17 frequentemente requer a presença de IL-6 e o fator de transformação do crescimento beta (TGF- β) (CHEN; LAURENCE; O'SHEA, 2007), sendo um perfil de resposta imunológica protetora contra infecções bacterianas e fúngicas (CROME; WANG; LEVINGS, 2010).

As lectinas isoladas de sementes de *Cratylia mollis* (Cramoll) foram descritas como indutoras da produção de IL-6, IL-17A, IL-22 e IL-23 em cultura, estando

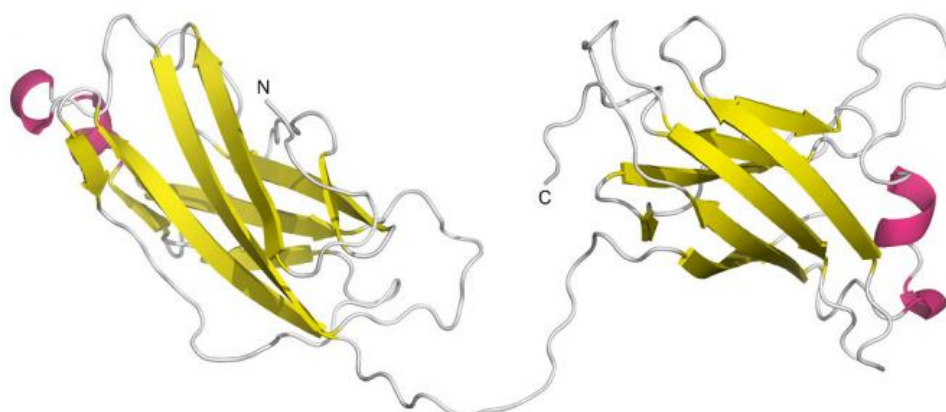
possivelmente relacionada à manutenção do perfil Th17 (STELA *et al.*, 2013). Células T CD4 + e CD8 + estimuladas com uma lectina obtida de sementes de *Artocarpus heterophyllus* (ArtinM) aumentaram sua atividade mitocondrial, produção de IL-2, e apresentaram perfil pró-inflamatório/antitumoral (DA SILVA *et al.*, 2017). A produção de IL-10 e TNF- α foi observada em células estimuladas com uma lectina isolada do veneno de *Bothrops jararacussu* (PIRES *et al.*, 2019).

Contraditoriamente, as lectinas podem influenciar negativamente a ativação e proliferação de linfócitos. Zhao *et al* (2017) demonstraram que a lectina de ligação a manana inibia a proliferação de células T CD4+ e CD8+, juntamente com uma redução na expressão de marcadores de ativação como CD69, CD25, HLA-DR e CD71 (ZHAO *et al.*, 2017). Isso enfatiza os múltiplos papéis que as lectinas podem ter na fisiologia das células imunes, estando essa capacidade diretamente relacionada à sua glicoproteína-alvo na superfície celular. Adicionalmente, alterações nos padrões de glicosilação estão frequentemente presentes em patologias (STANAWAY; GILL, 2000; VARKI *et al.*, 2017), sendo que técnicas para o reconhecimento estrutural de glicoconjugados para posterior análises dos mesmos tem sido desenvolvidas utilizando-se da capacidade de lectinas de fazê-lo (WU *et al.*, 2009).

1.6 Lectina do tipo TRAF – BOL

Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa purificaram e caracterizaram uma lectina em extratos de *Brassica oleracea* ssp. *Botrytis* (BOL). A BOL é uma proteína não glicosilada de aproximadamente 34 kD, com 100% de homologia com uma proteína putativa do tipo TRAF de *Brassica rapa* e *Brassica napus*, sendo a primeira lectina do tipo-TRAF a ser reportada. A proteína madura contem 301 aminoácidos, com uma estrutura tridimensional similar a uma cúpula (Figura 1). Possui em sua estrutura apenas dois domínios MATH, sem nenhum outro tipo de domínio, o que indica a relação deste com a sua atividade lectínica.

Figura 1 - A estrutura da lectina de *Brassica oleracea*.



Fonte: a autora. A lectina apresenta uma estrutura com uma dobra similar a cúpula, típica das lectinas do tipo L, contendo apenas domínios MATH em sua estrutura. O modelo foi gerado com o RaptorX usando como modelo a 2F1X. Em vermelho, hélices; em amarelo, folhas β ; em cinza, os loops. N e C indicam as extremidades N- e C-terminais da proteína.

Sua atividade hemaglutinante apresenta-se ativa numa faixa de 4 °C a 60 °C, e possui estabilidade entre os pH 7 – 8. Não apresenta inibição de atividade por mono-, di- ou tri-sacarídeos, sendo inibida apenas por carboidratos complexos. Foi ainda reportado a habilidade de BOL aumentar a fagocitose e induz a produção de óxido nítrico com macrófagos (DUARTE *et al.*, 2017).

Entretanto, diversos fatores funcionais relativos à BOL ainda não foram elucidados. Sabendo que a BOL é capaz de induzir a ativação de macrófagos, é necessário compreender o processo de sinalização celular ao qual a BOL encontra-se relacionada e que permite deflagrar uma resposta celular, bem como conhecer suas glicoproteínas-alvo com as quais essa lectina interage, não apenas em macrófagos, como também nos demais leucócitos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Verificar a interação da lectina BOL com células do sistema imunológico e elucidar seu envolvimento na sinalização celular a partir da identificação de seus ligantes.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a capacidade da lectina BOL de se ligar em linfócitos e monócitos;
- Verificar a capacidade da lectina BOL induzir proliferação em esplenócitos;
- Identificar os possíveis ligantes da lectina BOL;
- Predizer *in silico* os sítios de N- e O-glicosilação possíveis nos ligantes da lectina BOL;
- Predizer *in silico* a acessibilidade dos resíduos na superfície proteica;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Declaração de Ética

O Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Viçosa aprovou o estudo dos animais, Protocolo n. 45/2013, realizado de acordo com os Princípios Éticos em Pesquisa em Animais adotados pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA, Lei nº 11.794 / 2008).

3.2 Animais

Camundongos BALB/c machos adultos, com 6 a 8 semanas de idade, foram obtidos no biotério da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil. Os animais foram mantidos em um ciclo 12:12h claro-escuro, em ambiente controlado (25 °C), com água e alimentos *ad libitum*, sob condições higiênicas otimizadas.

3.3 Lectinas

A lectina do tipo TRAF nativa (BOL) foi purificada como descrito anteriormente (DUARTE *et al.*, 2017) de extrato salino de *Brassica oleracea* ssp. *botrytis*. A marcação de BOL com FITC seguiu o protocolo do fabricante, na proporção de 1:50 (BOL:FITC, v/v) (Sigma, Cas #: 3326-32-7).

3.4 Obtenção das células

O baço de camundongo BALB/c foi retirado em ambiente estéril e perfundido com meio de cultura RPMI em placa de petri, para retirada das células. As células foram incubadas por 5 minutos com tampão de lise de hemácias (NH₄Cl 0,16 M, Tris-HCl 0,17 M, 9:1), seguido de centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos. Esse procedimento foi repetido até se obter um sedimento de aspecto límpido esbranquiçado. Após centrifugação, o sedimento de leucócitos foi então ressuspensionado em meio RPMI para contagem em câmara de Neubauer, sendo a

concentração final ajustada com meio de cultura.

3.5 Citometria de fluxo

As células foram incubadas com BOL-FITC em diferentes concentrações (15 – 0,94 µg/mL) por 15 min a 4 °C. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato (NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 40 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, pH 7,5) e analisadas por citometria de fluxo (FACSVerse™, BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). O programa *FACSuite Software* (San Jose, CA, USA) foi utilizado para aquisição dos dados. Os linfócitos e monócitos foram identificados através do padrão de tamanho vs. granulosidade celular, e isolados com uma *gate* onde 10.000 eventos foram adquiridos. Os dados foram analisados com o *software FlowJo*™ (v10.0.7, BD Biosciences, Ashland, OR, USA).

3.6 Ensaio de Proliferação Celular

Esplenócitos (1×10^4 /mL) foram distribuídos em microplacas de 96 poços e incubados por 48 horas a 37 °C com BOL (10 – 0,07 µg/mL) em diluição seriada 1:2. Poços contendo apenas células com meio foram designadas controle negativo. Após 44 horas de incubação, as células foram centrifugadas e deixadas com reagente de brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (concentração final de 0,5 mg/mL) a 37 °C por mais 4 h. Posteriormente, os cristais de formazan formados através da redução do MTT (MOSMANN, 1983) foram solubilizados com DMSO e a absorbância foi lida a 550nm em um leitor ELISA (Modelo ELx800; Bio-Tek Instruments, Winooki, EUA).

3.7 Cromatografia de Afinidade por lectina

3.7.1 Preparação da resina de afinidade de lectina

A BOL recombinante (rBOL) contendo uma cauda de Histidina foi expressa em *E. coli* DH5α (DUARTE, 2016) cultivada em meio LB suplementado com ampicilina

(50 µg/mL). Em seguida, a rBOL foi conjugada com esferas de Ni-NTA-Agarose (rBOL-Ni), de acordo com o protocolo do fabricante para gerar uma resina de afinidade de lectina (GE Healthcare).

3.7.2 Procedimento de cromatografia de afinidade baseado em rBOL

Para purificação por afinidade dos potenciais ligantes, as células do baço de camundongos foram obtidas em salina EDTA 1%, filtradas (0,45 µm) e lisadas com salina Triton X 0,1%. O lisado celular foi submetido a resina de afinidade rBOL-Ni (3 cm x 1 cm, id) previamente equilibrada com PBS. NaCl 150 mM foi usado para remover as proteínas não específicas. As proteínas ligadas foram eluídas com tampão de eluição (NaCl 150 mM, Imidazol 300 mM, PBS, pH 7,4) com fluxo de 1 mL/min a temperatura ambiente (25 °C). O teor de proteínas das frações foi monitorado pela mudança de absorbância a 280 nm no espectrofotômetro (Thermo Scientific).

3.8 Eletroforese das proteínas purificadas em cromatografia de afinidade por lectina

As proteínas eluídas da rBOL-Ni foram precipitadas em microtubos de 1,5mL utilizando-se ácido tricloacético (TCA) a 10%, por 30 minutos no gelo. Após a precipitação, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm/10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento contendo as proteínas foi lavado duas vezes com acetona gelada. As proteínas foram ressuspensas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,5M, SDS 2,5% m/v, glicerol 10% v/v, pH 6,5) e incubadas a 100 °C por 10 minutos.

A eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS – PAGE) foi realizada usando géis de poliacrilamida a 12% em condições dissociantes, em sistema Mini-Protean 3 (Bio-Rad Laboratories, Hécules, EUA). As amostras foram aplicadas nos poços do gel e a corrida eletroforética seguiu-se em solução tampão (Tris 24mM, glicina 192mM, SDS 1% m/v) por 45 min a 80-120mA, 190 V. Após corrida, a detecção foi realizada com azul de Coomassie Brilliant R-250 (Pierc Chemical Co., Rockfors, EUA). A fetuína (15 µg/mL) foi utilizada como peso padrão

de comparação por ser uma glicoproteína previamente identificada como reconhecida por BOL (DUARTE et al., 2017)

3.9 Western Blot

As membranas foram preparadas por eletrotransferência de das proteínas presentes no gel SDS-PAGE para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad) em tampão de transferência (glicina 192 mM, metanol a 20% v/v, Tris 25 mM) por 2 horas a 200 mA. Após a transferência, a membrana foi exposta à solução de bloqueio de gelatina (gelatina a 3%, Tris 25 mM, NaCl-HCl 150 mM, pH 7,5) durante 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada imersa em uma solução de BOL-FITC (diluição 1:100) por 1 hora. A transferência foi visualizada no sistema de imagem ChemiDoc MP (BioRad) equipado com laser para detecção a 488nm.

3.10 Sequenciamento proteico dos ligantes obtidos por coluna de afinidade de lectina

3.10.1 Digestão Triptica

Após confirmação dos possíveis ligantes pela análise de Western Blot, a banda detectada por fluorescência foi recortada dos géis. Em seguida, os fragmentos foram descorados com acetonitrila 50%/bicarbonato de amônio 25 mM, reduzidas com DTT 65 mM por 30 min a 56 °C e alquiladas com Iodoacetamida 200 mM por 30 min a temperatura ambiente. Após incubação, os fragmentos foram lavados com Acetonitrila, e secados em um sistema de SpeedVac (Thermo Savant, modelo SC250EXP, LabCommerce, Santa Clara, California, USA). As amostras foram digeridas usando cinco µg/mL de tripsina (Sigma) em acetonitrila 10%/bicarbonato de amônio 40 mM, pH 8,0 a 37 °C, por 24 horas. Os peptídeos foram extraídos com acetonitrila 50%/ácido fórmico 5%, e secos em sistema de SpeedVac, e redissolvidos em ácido fórmico a 0,1%.

3.10.2 Dessalinização e Concentração de Peptídeos

As amostras foram dessalinizadas usando C18 (Pierce C18 Spin Columns, Sigma), previamente ativada com metanol 50% e equilibrada com acetonitrila 5%/ácido fórmico 0,5%. As amostras previamente ressuspensas em acetonitrila 20%/ácido fórmico 2% foram aplicadas na coluna. A coluna foi lavada com acetonitrila 5%/ácido fórmico 0,5% e em seguida, os peptídeos foram eluídos com acetonitrila 40%, seguido de secagem em sistema SpeedVac.

3.10.3 Espectrometria de massas

Os peptídeos trípticos foram ressuspensos em MALDI-Matrix Universal (Sigma) e alíquotas foram aplicadas para análise pela técnica de ionização por dessorção de matriz assistida por laser (MALDI). Os espectros de massa foram adquiridos no modo de íon refletor na faixa de m/z de 640–3240 usando um espectrômetro de massa MALDI-TOF (4800 Proteomics Analyzer, AbSciex, Europe) controlado pelo *software flexAnalysis v. 2.0* (Bruker Daltonics). O instrumento foi equipado com um laser de raio inteligente (Bruker Daltonik), e a aquisição de energia do laser foi otimizada usando a mistura de calibração PS antes da coleta dos dados da amostra.

3.10.4 Pesquisa no banco de dados

As massas peptídicas oriundas do MALDI-TOF foram submetidas à busca no MS-FIT Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu>) e/ou MASCOT (www.matrixscience.com) para identificação de proteínas por mapa de peptídeos. O NCBI com cobertura global envolvendo todos os organismos foi empregado como banco de dados na busca.

3.11 Determinação da glicosilação de proteínas e acessibilidade da superfície

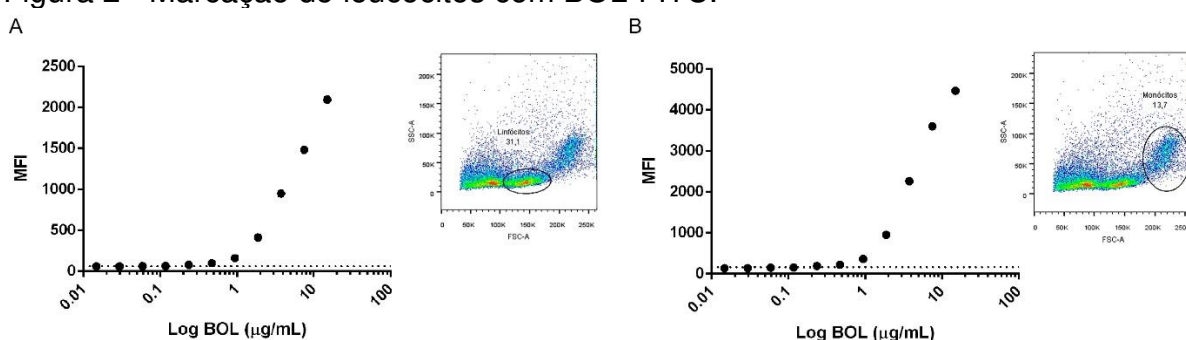
Como o BOL é uma lectina, foram previstos locais de N e O-glicosilação nos possíveis ligantes identificados no MS/MS a partir das ferramentas online NetNGlyc e NetOGLyc 4.0, respectivamente (GUPTA; JUNG; BRUNAK, 2004; STEENTOFT *et al.*, 2013). As proteínas também foram submetidas à ferramenta *online* Netsurfp (PETERSEN *et al.*, 2009) para analisar se os locais previstos N e O-glicosilados estão realmente expostos na superfície das proteínas.

4 RESULTADOS

4.1 BOL é capaz de se ligar à superfície celular de linfócitos e monócitos de maneira dose-dependente

Diferentes concentrações (15 – 0,94 $\mu\text{g/mL}$) de BOL-FITC foram incubadas com leucócitos periféricos de Balb/C e analisadas por citometria de fluxo. Foi possível observar que BOL reconhece possíveis glico-alvos na superfície de linfócitos e monócitos, e esse reconhecimento ocorre de maneira dose-dependente (Figura 2). Conforme há um aumento na concentração de BOL-FITC para o reconhecimento de glicoconjugados na membrana celular, há um aumento da intensidade média de fluorescência (MFI) tanto em linfócitos (Figura 2A) quanto em monócitos (Figura 2B), indicando que há um número proporcional de glico-alvos na superfície dessas células para ligação à BOL.

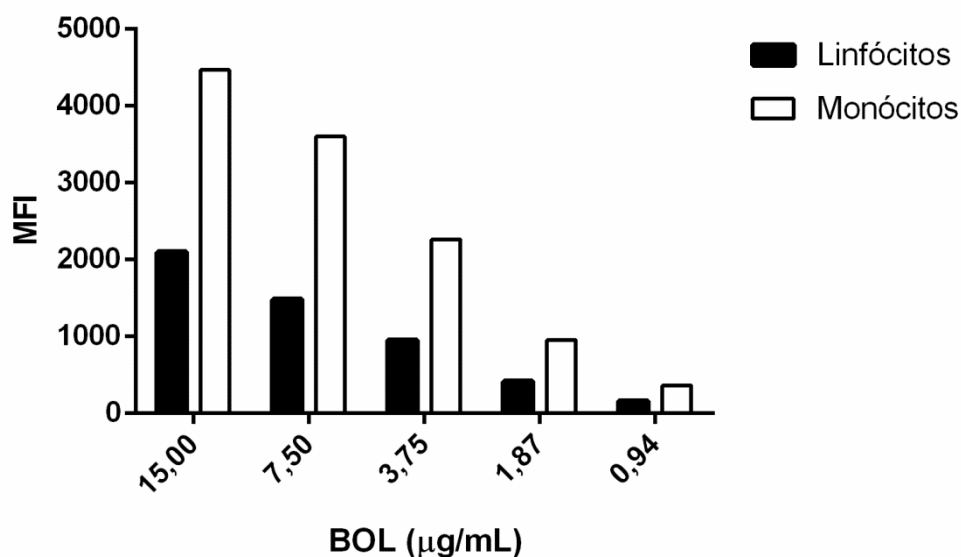
Figura 2 - Marcação de leucócitos com BOL-FITC.



Fonte: a autora. MFI de BOL-FITC ligada à superfície de (A) linfócitos identificados a partir de uma seleção na população (tamanho vs. granulosidade) (B) monócitos identificados a partir de uma seleção na população (tamanho vs. granulosidade).

A intensidade média de fluorescência da marcação de BOL à superfície celular foi em média duas vezes maior em monócitos quando comparado a linfócitos, em todas as concentrações utilizadas (Figura 3). Isso indica que monócitos parecem dispor de duas vezes mais sítios alvos de ligação à BOL em sua superfície quando comparados a linfócitos.

Figura 3 - Relação da MFI entre linfócitos e monócitos.

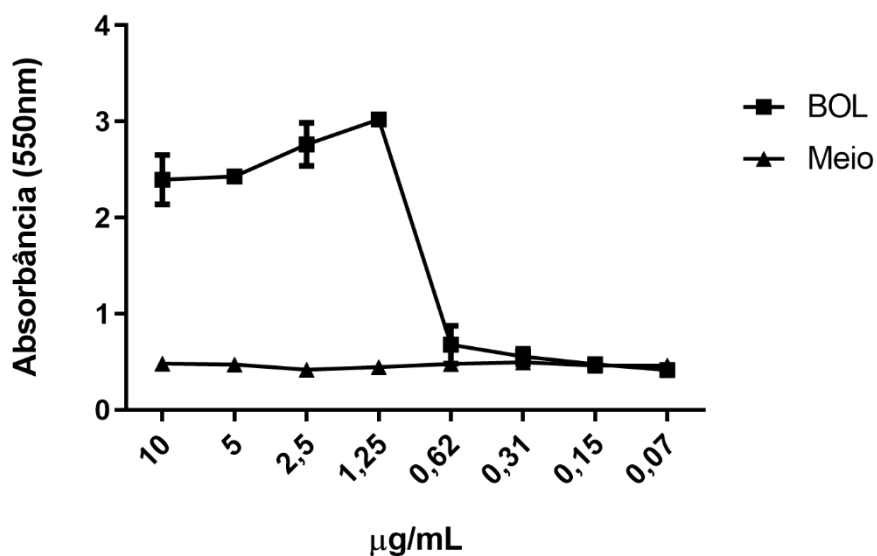


Fonte: a autora. A análise da relação da marcação de BOL na superfície de monócitos indica que essa ligação é em média duas vezes maior quando comparado à marcação em linfócitos.

4.2 BOL é capaz de induzir proliferação de linfócitos

Como a BOL foi capaz de reconhecer e se ligar aos linfócitos, testamos sua capacidade de induzir proliferação celular. Esplenócitos de camundongos BALB/c foram cultivados na presença de BOL em diferentes concentrações (10 – 0,07 µg/mL), sendo possível observar resposta mitogênica nos esplenócitos estimulados comparado com as células não estimuladas (Figura 3). A dose mínima para se obter uma resposta proliferativa foi observada na concentração final de 1,25 µg/mL de BOL.

Figura 4 - Ensaio de proliferação celular.

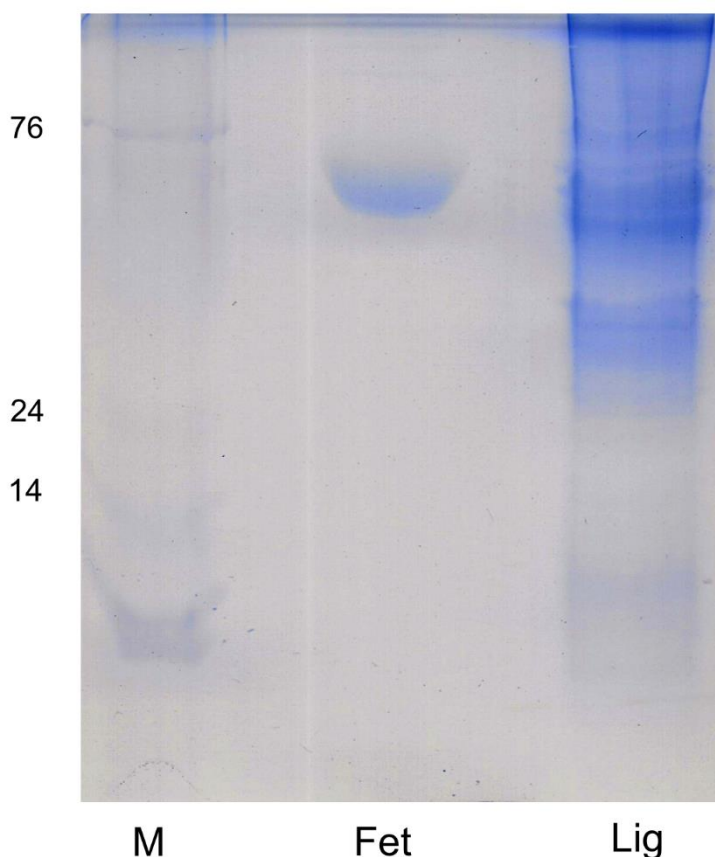


Fonte: a autora. Esplenócitos de camundongos foram cultivados com diferentes concentrações da lectina BOL, sendo possível observar indução da proliferação celular.

4.3 Identificação de possíveis ligantes de BOL por cromatografia de afinidade

A purificação dos ligantes de BOL envolveu a preparação da coluna de afinidade de lectina. A fração eluída da resina de afinidade foi aplicada nos poços do gel SDS-PAGE. Os ligantes purificados apareceram como múltiplas bandas em SDS-PAGE (Figura 5), com diferentes pesos moleculares, além de ser possível observar a banda de Fetuína próxima ao padrão molecular 76 kDa.

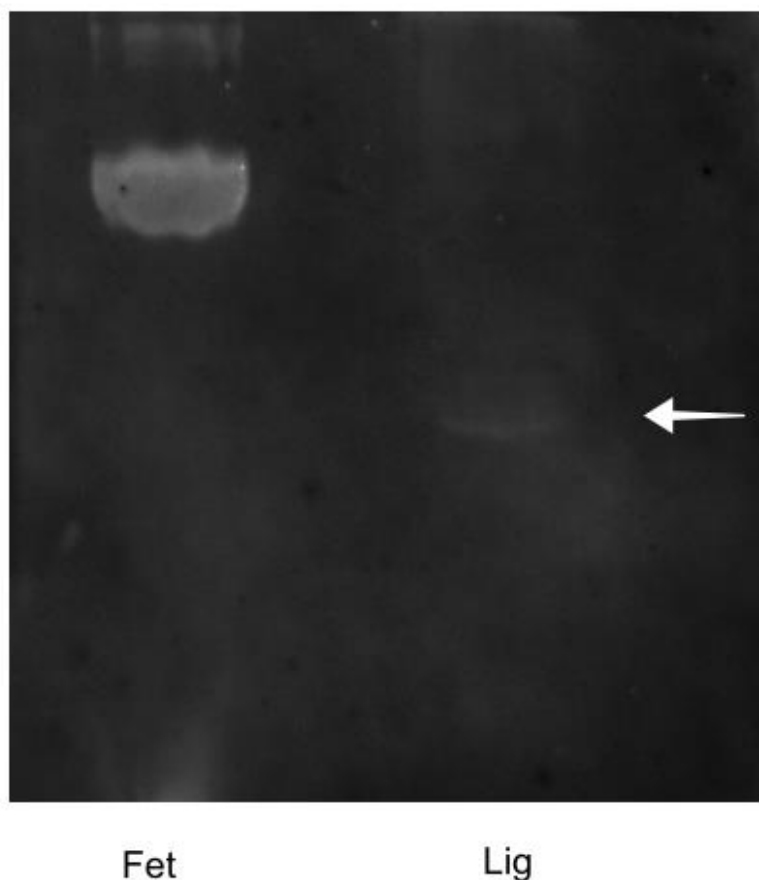
Figura 5 - SDS-PAGE 12% das proteínas purificadas por cromatografia de afinidade por lectina.



Fonte: a autora. As proteínas foram eluídas da rBOL-Ni e aplicadas em gel SDS-PAGE para observação da separação das bandas dos possíveis ligantes da BOL. M: Padrão molecular de proteínas com massas conhecidas; Fet: Fetúina (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Peso molecular = 48 kDa). Lig: Proteínas eluídas da rBOL-Ni, possíveis ligantes de BOL.

Para investigar qual das bandas apresentava maior afinidade pela BOL, as proteínas presentes no SDS-PAGE foram eletrotransferidas para membrana de nitrocelulose. Embora várias proteínas tenham sido eluídas na cromatografia de afinidade, apenas uma banda muito proeminente foi detectada através do sistema de fluorescência (Figura 6).

Figura 6 - Western Blot das proteínas purificadas por cromatografia de afinidade por lectina.



Fonte: a autora. Após corrida, as proteínas presentes no SDS-PAGE foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose e reveladas por fluorescência. Seta = banda reconhecida por BOL-FITC indicando o local dos ligantes de BOL. Fet: Fetuína (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Peso molecular = 60 kDa). Lig: Proteínas eluídas da rBOL-Ni, possíveis ligantes de BOL.

4.4 BOL apresenta 4 potenciais ligantes em leucócitos

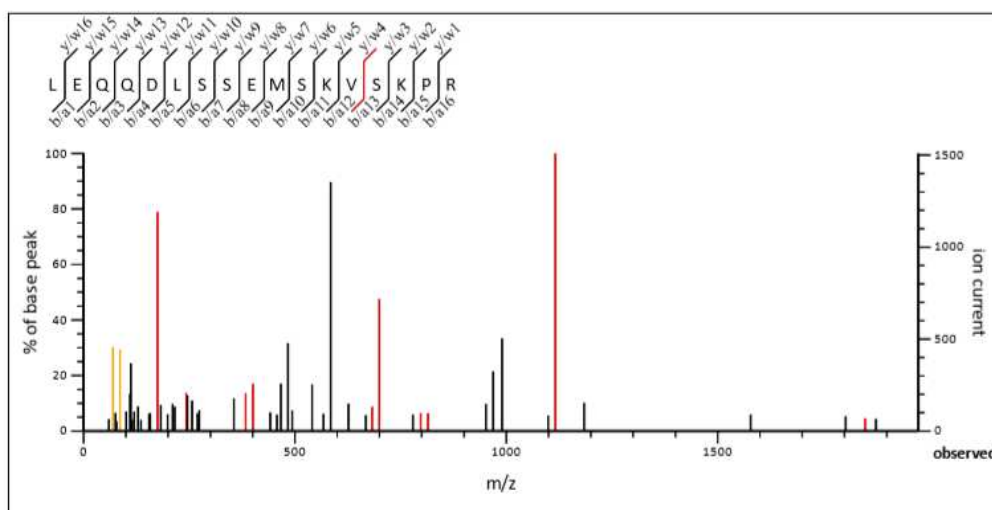
A banda identificada pelo sistema de fluorescência foi recortada do gel e submetida à um protocolo de digestão com tripsina para posterior análise por MALDI-TOF. As massas isotópicas de cada peptídeo foram utilizadas para busca no *software* MASCOT juntamente com o BLAST, onde foi possível identificar quatro possíveis ligantes da lectina BOL.

A análise dos peptídeos sequenciados evidenciou a presença de uma proteína denominada Fator de Transcrição Geral 3C polipeptídeo 2 (*General transcription factor*

C2 polypeptide 2, TF3C2), identificada em *Pongo abelii* (Figura 6), no software MASCOT. Análises utilizando o BLAST identificaram o peptídeo como sendo pertencente a mesma proteína, com um score total de 56,6, uma cobertura (*Query Cover*) de 100% e E-value de 4×10^{-8} , pertencente ao organismo *Lynx pardinus*. A proteína é presente tanto em *Homo sapiens* quanto *Mus musculus*, sendo este último o organismo modelo utilizado em nossos estudos.

Figura 7 - Análise de espectrometria de massa e MASCOT do peptídeo de TF3C2.

MS/MS Fragmentation of **LEQQDLSEM**SKVSKPR
 Found in **TF3C2_PONAB** in **SwissProt**, General transcription factor 3C polypeptide 2 OS=Pongo abelii OX=9601 GN=GTF3C2 PE=2 SV=1
 Match to Query 3: 1961.008624 from(1962.015900,1+) intensity(1000.0000) index(3)
 Data file Amostra-01_SFP_manual_2019-10-18.mgf

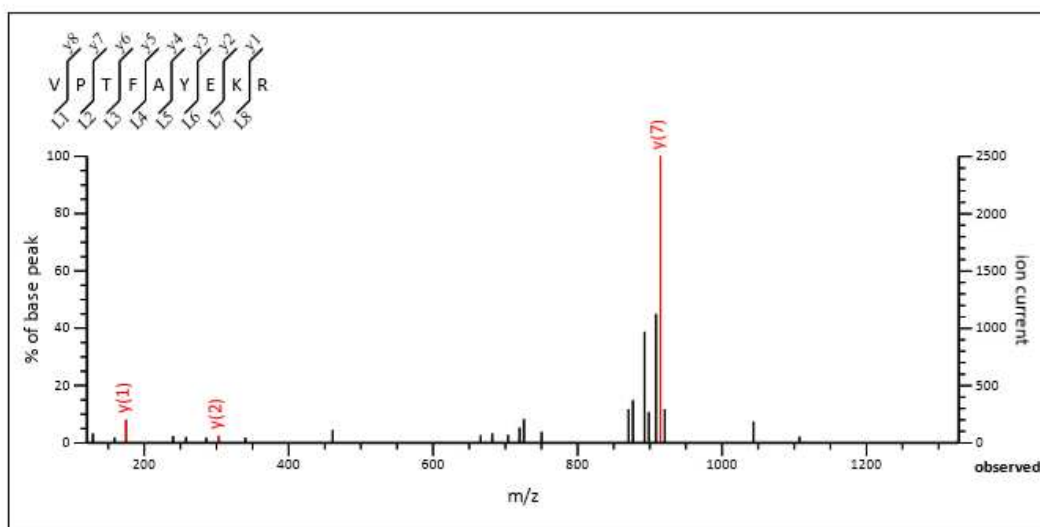


Fonte: a autora. Através do sequenciamento do pico mais intenso, obteve-se “LEQQDLSEM SKVSKPR”. A análise da sequência utilizando o software MASCOT identificou o peptídeo como sendo Fator de Transcrição Geral 3C polipeptídeo 2 (TF3C2) de *Pongo abelii*.

Outra proteína identificada pelo software MASCOT foi a proteína do tipo Fer3 (*Fer3-like protein*, FER3L), identificada em *Homo sapiens* (Figura 7). Análises utilizando o BLAST acusaram que o peptídeo “VPTFAYEKR” é referente à uma quinase (*Inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol-pentakisphosphate kinase*) de *Cyphomyrmex costatus*, com um score total de 32,9, uma cobertura de 100% e um E-value de 2,4. A proteína também encontra-se presente em *Mus musculus* (dados não mostrados), o organismo modelo utilizado em nossos estudos.

Figura 8 - Análise de espectrometria de massa e MASCOT do peptídeo de FER3L.

MS/MS Fragmentation of **VPTFAYEKR**
 Found in **FER3L_HUMAN** in **SwissProt**, Fer3-like protein OS=Homo sapiens OX=9606 GN=FERD3L PE=1 SV=1
 Match to Query 1: 1109.536024 from(1110.543300,1+) intensity(79.9525) index(2)
 Data file Amostra-01_SFP_manual_2019-10-18.mgf

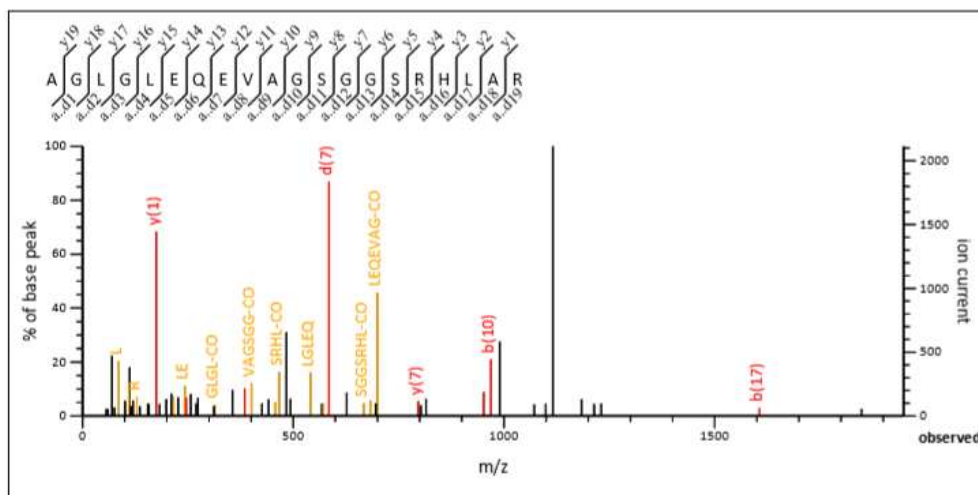


Fonte: a autora. Através do sequenciamento do pico mais intenso, obteve-se “VPTFAYEKR”. A análise da sequência utilizando o *software* MASCOT identificou o peptídeo como sendo a proteína do tipo Fer3 (FER3L) de *Homo sapiens*.

A terceira proteína identificada como possível ligante da lectina BOL foi a Nestina (*Nestin*, NEST), uma proteína de filamento intermediário do tipo IV, identificada em *Mesocricetus auratus* (Figura 9). Análises utilizando o BLAST obtiveram resultado similar ao MASCOT, acusando pertencimento do peptídeo “AGLGLEQEVAGSGSRHLAR” a proteína Nestina no organismo citado, com um score total de 61,3, uma cobertura de 100% e um E-value de 2×10^{-9} . A proteína também é expressa em *Mus musculus* (dados não mostrados).

Figura 9 - Análise de espectrometria de massa e MASCOT do peptídeo de NEST.

MS/MS Fragmentation of **AGLGLQEVEVAGSGGSRHLAR**
 Found in **NEST_MESAU** in **SwissProt**, Nestin (Fragments) OS=Mesocricetus auratus OX=10036 GN=NES PE=1 SV=2
 Match to Query 4: 1963.960224 from(1964.967500,1+) intensity(138.8836) index(1)
 Data file Amostra-01_SFP_manual_2019-10-18.mgf

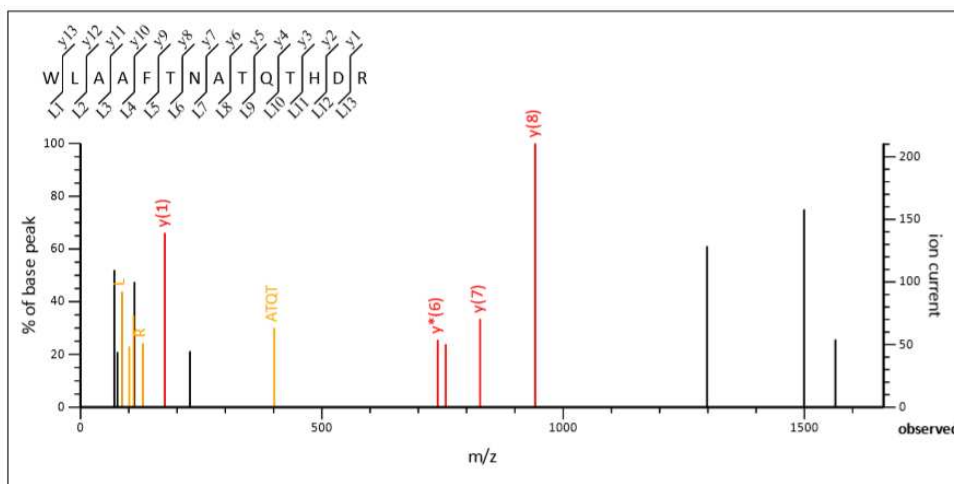


Fonte: a autora. Através do sequenciamento do pico mais intenso, obteve-se “AGLGLQEVEVAGSGGSRHLAR”. A análise da sequência utilizando o *software* MASCOT identificou o peptídeo como sendo a proteína Nestina (NEST) de *Mesocricetus auratus*.

Por fim, o MASCOT identificou através do peptídeo “WLAAFTNATQTHDR”, a Proteína 1 Extracelular Rica em Repetições de Leucina Contendo o Domínio Tipo III de Fibronectina (*Extracellular leucine-rich repeat and fibronectin type-III domain-containing protein 1*, ELFN1) em *Mus musculus* (Figura 10). As análises no BLAST retornaram resultado similar ao MASCOT, indicando que o peptídeo se alinha com a proteína precursora de ELFN1 de *Mus musculus*, com um score total de 49,4, uma cobertura de 100% e um E-value de 9×10^{-6} .

Figura 10 - Análise de espectrometria de massa e MASCOT do peptídeo de ELNF1.

MS/MS Fragmentation of **WLAAFTNATQTHDR**
 Found in **ELNF1_MOUSE** in **SwissProt**, Protein ELNF1 OS=Mus musculus OX=10090 GN=Elfn1 PE=2 SV=1
 Match to Query 2: 1630.806824 from(1631.814100,1+) intensity(99.2234) index(0)
 Data file Amostra-01_SFP_manual_2019-10-18.mgf



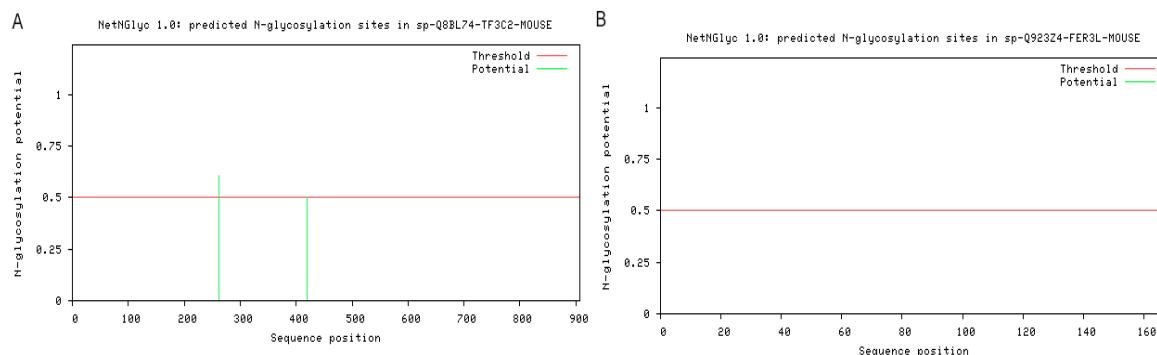
Fonte: a autora. Através do sequenciamento do pico mais intenso, obteve-se “WLAAFTNATQTHDR”. A análise da sequência utilizando o *software* MASCOT identificou o peptídeo como sendo a Proteína 1 Extracelular Rica em Repetições de Leucina Contendo o Domínio Tipo III de Fibronectina (ELNF1) de *Mus musculus*.

4.5 Os potenciais ligantes de BOL possuem sítios de N- e O-glicosilação acessíveis na superfície proteica

Com o intuito de confirmar se as proteínas identificadas como ligantes da lectina BOL são glicoproteínas, os prováveis sítios de glicosilação foram identificados, juntamente com a predição de acessibilidade de superfície.

As análises *in silico* utilizando o servidor NetNGlyc indicaram que a proteína TF3C2 (GTF3C1) apresentou dois resíduos de Asparagina preditos como sítios de N-glicosilação, (Asn-262 e Asn-420), e também preditos como acessíveis a solventes, ou seja, totalmente expostos na superfície da proteína enovelada, o que permite o acesso da maquinaria de glicosilação (Figura 11A). A proteína FER3L foi a única proteína sem sítios possíveis para N-glicosilação (Figura 11B).

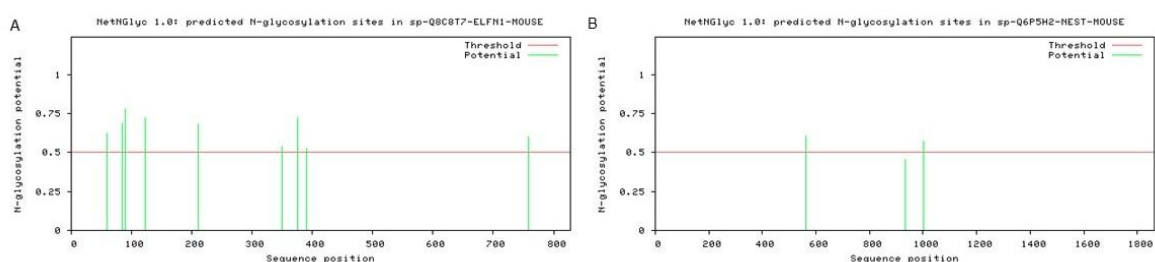
Figura 11 - Predição de glicoproteínas.



Fonte: a autora. Predição dos possíveis sítios de N-glicosilação nas proteínas (A) TF3C2 e (B) FER3L identificadas por sequenciamento proteico MALDI/TOF-TOF.

Dos nove resíduos preditos como locais de N-glicosilação para ELFN1 (Figura 12A), cinco deles também foram preditos expostos na superfície, sendo estes os resíduos Asn-85 (Potencial de modificação: NLTY), Asn-122 (NLTE), Asn-376 (NYTY), Asn-391 (NHTC) e Asn-759 (NLSY). E por fim, a NEST apresentou 2 resíduos preditos como locais de N-glicosilação (Figura 12B), Asn-563 e Asn-1002, ambas também preditas como expostas na superfície da proteína.

Figura 12 - Predição de glicoproteínas.

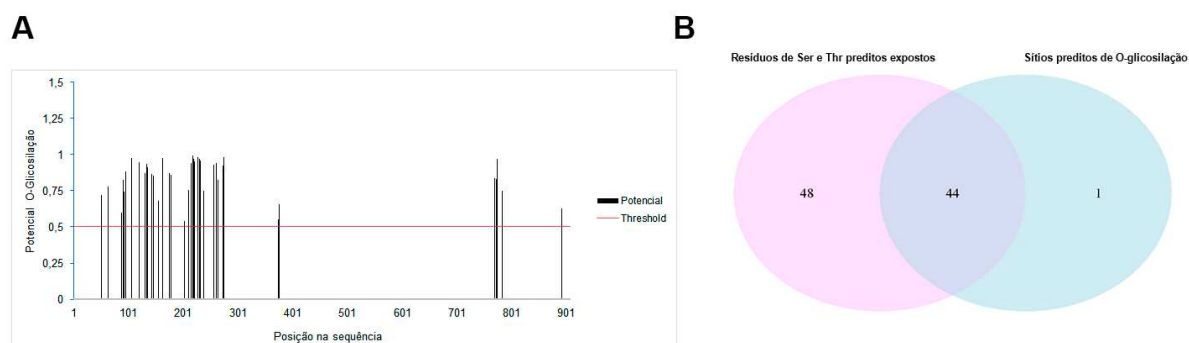


Fonte: a autora. Predição dos possíveis sítios de N-glicosilação nas proteínas (A) ELFN1 e (B) NEST identificadas por sequenciamento proteico MALDI/TOF-TOF.

A análise de predição utilizando o servidor NetOGlyc 4.0 indicou que todas as proteínas identificadas no MALDI/TOF apresentam possíveis sítios de O-glicosilação. A TF3C2 (GTF3C2) apresentou 92 resíduos de Serina e Treonina preditos como expostos na estrutura tridimensional da proteína e 45 possíveis sítios alvos de O-glicosilação (Figura 13A). A intersecção entre esses dois valores é de 44 resíduos de

aminoácidos preditos como sítios de O-glicosilação de fato expostos na superfície de TF3C2 (Figura 13B).

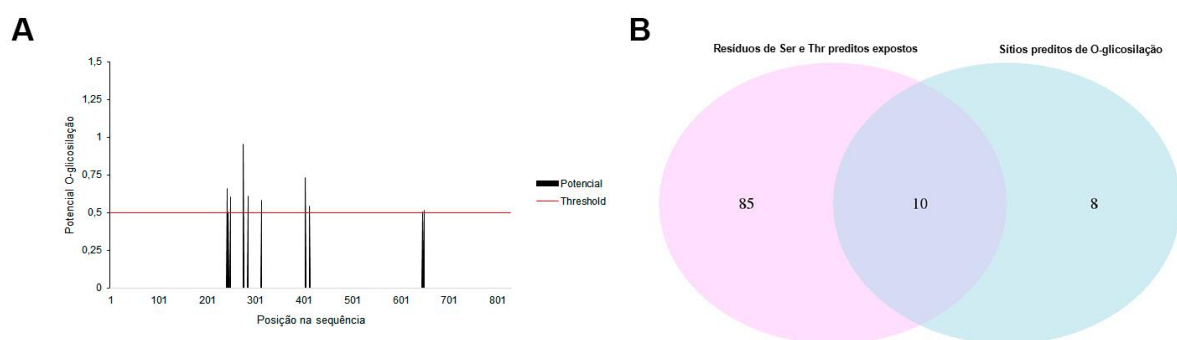
Figura 13 - Predição de sítios de glicosilação e acessibilidade de aminoácidos da proteína TF3C2.



Fonte: a autora. (A) Potenciais sítios de O-glicosilação ($threshold > 0,5$) e (B) Diagrama de Venn indicando os aminoácidos mutualmente preditos expostos na superfície proteína que são potenciais sítios de O-glicosilação.

A proteína ELNF1 apresentou 18 sítios possíveis de O-glicosilação (Figura 14A) e 95 resíduos de Serina e Treonina preditos como expostos na superfície celular; dentre estes, apenas 10 resíduos de fato poderiam ser glicosilados, pois estão preditos como expostos na superfície proteica (Figura 14B), de acordo a ferramenta *online* Netsurfp.

Figura 14 - Predição de sítios de glicosilação e acessibilidade de aminoácidos da proteína ELNF1.

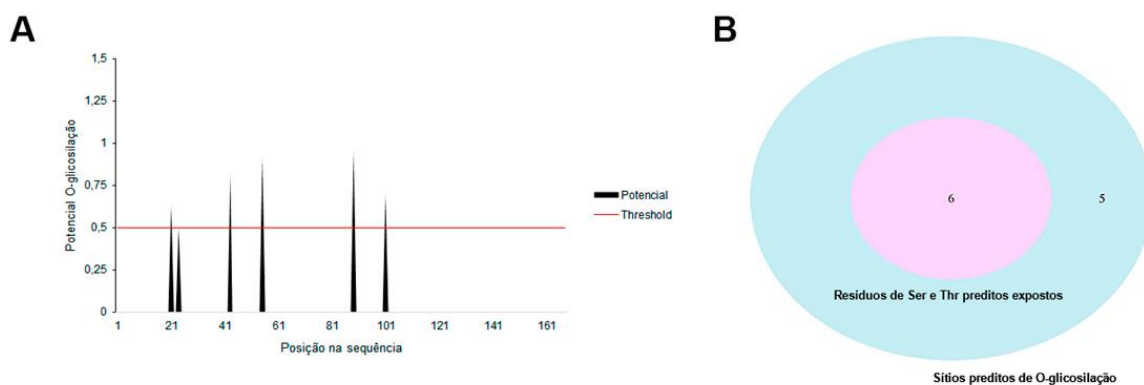


Fonte: a autora. A) Potenciais sítios de O-glicosilação ($threshold > 0,5$) e B) Diagrama de Venn indicando os aminoácidos mutualmente preditos expostos na superfície proteína que são potenciais sítios de O-glicosilação.

A proteína FERL3 apresentou o menor número de resíduos acessíveis a solventes na superfície da proteína, e igualmente um menor número de sítios

possíveis para O-glicosilação, (Figura 15A), os quais foram todos preditos como expostos na superfície proteica (Figura 15B).

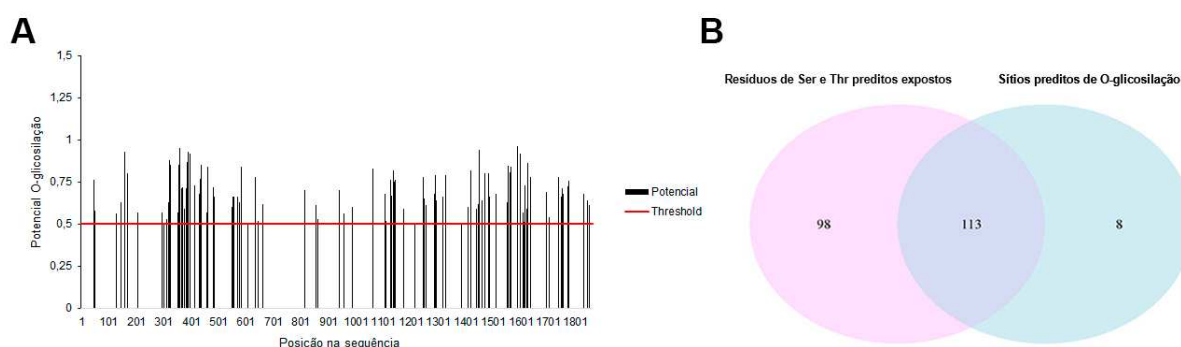
Figura 15 - Predição de sítios de glicosilação e acessibilidade de aminoácidos da proteína FERL3.



Fonte: a autora. A) Potenciais sítios de O-glicosilação ($threshold > 0,5$) e B) Diagrama indicando os aminoácidos mutuamente preditos expostos na superfície proteica que são potenciais sítios de O-glicosilação.

A quarta proteína identificada como possível ligante da lectina BOL, Nestina, possui 121 possíveis sítios de O-glicosilação (Figura 16A) e 211 resíduos de Ser e Thr preditos acessíveis a solventes na proteína. A intersecção entre esses dois valores é de 113 resíduos desses aminoácidos preditos como sítios de O-glicosilação de fato expostos na superfície da Nestina (Figura 16B).

Figura 16 - Predição de sítios de glicosilação e acessibilidade de aminoácidos da proteína NEST.



Fonte: a autora. A) Potenciais sítios de O-glicosilação ($threshold > 0,5$) e B) Diagrama indicando os aminoácidos mutuamente preditos expostos na superfície proteica que são potenciais sítios de O-glicosilação.

O uso das ferramentas para a predição de possíveis sítios de glicosilação

juntamente com a predição da exposição desses resíduos na superfície da estrutura tridimensional de proteínas reforçam a probabilidade das proteínas identificadas no sequenciamento por MALDI/TOF-TOF serem glicoproteínas, e desse modo, serem ligantes da lectina BOL. A partir da modificação pós-traducional de glicosilação, seria possível o reconhecimento e interação entre as glicoproteínas e a lectina em estudo.

5 DISCUSSÃO

As glicoproteínas da membrana celular e do citoplasma refletem identidades e funções celulares específicas (ITAKURA; SASAKI; TOYODA, 2018; TOYODA *et al.*, 2011), portanto, o reconhecimento e ligação de lectinas à essas proteínas é uma etapa essencial para induzir uma resposta imune ou deflagrar uma sinalização celular (COLTRI *et al.*, 2008; RUAS *et al.*, 2009). Resultados anteriores obtidos em nosso laboratório demonstraram que uma proteína do tipo TRAF com atividade de lectina (BOL) possui atividade imunomoduladora em macrófagos (DUARTE *et al.*, 2017). Este estudo forneceu a primeira evidência da capacidade da BOL de estimular a fagocitose e induzir produção de espécies reativas de oxigênio. Neste estudo, corroboramos essas descobertas anteriores demonstrando que BOL é capaz de reconhecer e se ligar às superfícies celulares de linfócitos e monócitos e, partir das proteínas sequenciadas como possíveis ligantes de BOL, analisamos seu potencial participação no processo de sinalização celular.

Os efeitos imunomoduladores das lectinas já foram extensivamente reportados na literatura (CORIOLANO *et al.*, 2012; PINEAU *et al.*, 1990; STOJANOVIĆ *et al.*, 2010). A Concanavalina A e a Fitohemaglutinina são lectinas comprovadamente relacionadas à indução de mitose em linfócitos (NOWELL, 1960a; WECKSLER; LEVY; JAFFÉ, 1968). A proliferação celular é um processo necessário para a ativação de células imunes estimuladas por antígenos específicos (GANESHAN; CHAWLA, 2014), e é mediada por citocinas específicas que estabelecem a eficiência funcional do sistema imunológico (GANESHAN; CHAWLA, 2014). Nesse estudo, demonstramos que linfócitos estimulados por 48 horas com diferentes concentrações de BOL apresentaram extensiva proliferação celular, mesmo em doses mais baixas, sendo a concentração mínima de 1,25 µg/mL suficiente para estimular esplenócitos a entrarem em divisão. Adicionalmente a esse resultado, a ligação dose-dependente observada de BOL à superfície de linfócitos, por análise de citometria de fluxo, indicam que BOL se liga intensivamente à superfície dessas células, e parece envolver uma forte transdução de sinais que culminam, desse modo, na intensa proliferação celular observada.

A deflagração de uma sinalização celular que resulta em uma resposta, como

ativação ou proliferação celular, é dependente da ligação de fatores que estimulam tal resposta na membrana celular (PAWSON; NASH, 2000). Essa ligação requer, por parte dos receptores, uma estrutura adequada que permita o reconhecimento do ligante e assim, a transdução do seu sinal.

Proteínas são biomoléculas organizadas espacialmente em estruturas tridimensionais com funções específicas. A estrutura de uma proteína tem relação direta com sua função, sendo que sua conformação espacial e sua sequência aminoacídica permitem a formação de motivos e domínios proteicos que, em geral, estão relacionados com a função exercida por esta biomolécula (HVIDSTEN *et al.*, 2009; ORENCO; TODD; THORNTON, 1999).

Domínios proteicos são unidades estruturais independentes e em geral conservadas. Domínios com similaridades em sua sequência aminoacídica em geral, costumam compartilhar funções homólogas (DAWSON *et al.*, 2017). A atividade lectínica da BOL parece ser promovida pelos dois domínios MATH, uma vez que esta possui uma estrutura sem nenhum outro domínio proteico. Os domínios MATH nunca foram relatados como mediadores das atividades de reconhecimento de carboidratos e aglutinação, entretanto, várias proteínas humanas possuem domínios MATH em sua estrutura, estando frequentemente envolvidas em interações proteína-proteína e na sinalização celular (ZAPATA; MARTÍNEZ-GARCÍA; LEFEBVRE, 2007).

De modo geral, o domínio MATH, nas proteínas descritas contendo-o em suas estruturas, parece estar associado à presença de outros domínios proteicos, como domínios BTB/POZ e TRIM37 (ZAPATA *et al.*, 2001), domínios com envolvimento conhecido nos processos de ubiquitinação e degradação de proteínas, e sinalização intracelular. Por exemplo, a família BTB/POZ é composta por um grupo de proteínas amplamente estudado, tendo sido descoberto em *Drosophila melanogaster* (GODT *et al.*, 1993). Funcionalmente, este domínio é envolvido com a homo e heterodimerização de proteínas (BONCHUK *et al.*, 2011), sendo comumente presente em proteínas dedo de zinco, e por isso, tem sido sugerido que proteínas com domínio BTB exerçam atividades como fatores de transcrição celular (DAVIES *et al.*, 2013).

Quatro possíveis ligantes de BOL (ELFN1, TF3C2, NEST e FER3L) foram identificados a partir da cromatografia de afinidade por lectina seguida de sequenciamento proteico. Embora nenhuma dessas proteínas esteja diretamente relacionada ao sistema imunológico, elas estão envolvidas na sinalização celular de

alguma forma. Por exemplo, o Fator de Transcrição Geral 3C polipeptídeo 2 (TF3C2) é um fator de ligação ao DNA necessário para a transcrição dos genes de tRNA e 7SL (SCHRAMM, 2002). Esse fator de transcrição já foi reportado como responsável por regular a expressão dos genes *c-Myc*, *Gtf3c5*, *Gtf3a*, *Ep300* e *Foxp3* em células-tronco espermatogonais (LABBÉ *et al.*, 2012). C-myc é uma proteína com funções bem descritas na literatura. O c-Myc é um fator de transcrição oncogênico relacionado com diversas atividades celulares, dentre elas, a indução da proliferação celular através da regulação de ciclinas dependentes de quinases na fase G1 (KUNDU; WANG; ROEDER, 1999), tendo um papel fundamental no desenvolvimento de linfócitos B, através da regulação do ciclo celular, metabolismo e apoptose (PÉREZ-OLIVARES *et al.*, 2018). Em estágios mais tardios de maturação, a expressão de c-Myc é induzida por fatores de crescimento e é necessária para a proliferação celular e formação do centro germinativo (CALADO *et al.*, 2012; DE ALBORAN *et al.*, 2001). Adicionalmente, o fator de transcrição da família Forkhead Box subgrupo P3 (FOXP3), atua na regulação da expressão de um amplo conjunto de genes que distinguem e identificam as células T imunoregulatórias, denominadas células CD4⁺ T_{reg}, responsáveis por suprimir a ativação e funcionamento de outros leucócitos (LU; BARBI; PAN, 2017). A expressão de FOXP3 é ativada através da via de sinalização do fator nuclear κ B (NF κ B), e requer ativação da via de RAS com as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (BENOIST; MATHIS, 2012; WILLOUGHBY *et al.*, 2007).

Ainda, células tumorais apresentam expressão anormal de RNA polimerase III (RNA pol III). A RNA pol III é responsável pela transcrição de produtos essenciais para a maquinaria de tradução celular, como tRNA, 5S rRNA, e 7SL RNA (WHITE, 1998). A ativação de TF3C2 tem sido associado com os níveis de transcritos de RNA pol III em amostras de câncer de ovário (WINTER *et al.*, 2000). Essa proteína é responsável pelo reconhecimento inicial para promoção da transcrição de RNA pol III, além de ter atividade de acetiltransferase de histonas, o que permite uma maior abertura da cromatina e o acesso de nucleossomos, o que viabiliza a transcrição (KUNDU; WANG; ROEDER, 1999). Esse conjunto de evidências indica a participação do TF3C2 em processos de sinalização e ativação celular. A identificação dessa proteína como possível ligante de BOL, juntamente com nossos resultados de proliferação celular, ressalta a possível participação de uma lectina em processos de sinalização

intracelulares que culminam numa atividade biológica específica, nesse caso a proliferação.

Dentre as outras proteínas identificadas, a ELFN1 (do inglês, *extracellular leucine-rich repeat fibronectin containing 1*) é uma proteína caracterizada pela presença de motivos LRR (repetições ricas em leucina), responsáveis pela interação proteína-ligantes (KOBÉ, 2001), sendo este domínio encontrado em uma variedade de proteínas, com funções bem conhecidas no sistema imune inato (NURNBERGER *et al.*, 2004). A ELFN1 tem sido descrita com expressão no sistema nervoso central, predominante no córtex e hipocampo, podendo também ser encontrada nos tecidos reprodutivos e endócrinos (DOLAN *et al.*, 2007). Apesar da ELNF1 não ter função e expressão descritas em células do sistema imune, as proteínas LRR em animais incluem os receptores *Toll-Like* e domínios citoplasmáticos do receptor Toll/IL-1 (DOLAN *et al.*, 2007). Adicionalmente, sua identificação em células do sistema imune através de sua purificação de lisado de leucócitos através de cromatografia de afinidade por lectina pode indicar um papel dessa proteína na sinalização dessas células e, desse modo, revelar a habilidade de uma lectina em participar de processos de sinalização intracelular em células do sistema imune.

As análises *in silico* revelaram informações relevantes acerca dos possíveis ligantes identificados. Duas análises foram realizadas, a predição de possíveis sítios de N- e O-glicosilação e a predição de acessibilidade de solvente, uma análise que visa observar quais resíduos encontram-se na superfície da proteína, desse modo, acessível não apenas para solventes, mas também para modificações pós-traducionais. Juntos, essas predições auxiliam na análise acerca das proteínas identificadas serem glicoproteínas. Dentre os ligantes sequenciados e identificados nesse trabalho, 3 deles apresentavam possíveis sítios de N-glicosilação, excetuando-se por NEST, e todas apresentavam sítios de O-glicosilação. Foi possível observar que grande parte dos resíduos preditos como sítios alvos de N- e O-glicosilação foram também preditos expostos na superfície da proteína, viabilizando essa modificação.

A associação de glicanos à proteínas e lipídeos de membrana e/ou intracelulares é de grande importância para diversas funções biológicas (MOREMEN; TIEMEYER; NAIRN, 2012). A glicosilação é a modificação pós traducional mais comum e mais complexa de proteínas, podendo afetar sua estrutura, função e localização (KRASNOVA; WONG, 2016).

Dado que nossa proteína de estudo é uma lectina, análises de sítios-alvo de glicosilação e acessibilidade das superfícies das proteínas à solventes é de grande importância para confirmar a capacidade da BOL reconhecer e se ligar a estas glicoproteínas. Neste trabalho observamos que os possíveis ligantes de BOL, identificadas como prováveis glicoproteínas, estão envolvidas em processos de sinalização intracelular, atuando como fatores de transcrição de genes envolvidos com proliferação celular, como o TF3C2 (KUNDU; WANG; ROEDER, 1999), ou citoesqueleto, como a Nestina (LIANG *et al.*, 2015; MOKRÝ *et al.*, 2008). Adicionalmente, estudos reportam a provável função do domínio MATH e sua presença em proteínas com outros domínios funcionais, relacionados a ubiquitinação e sinalização intracelular (ZAPATA *et al.*, 2001; ZAPATA; MARTÍNEZ-GARCÍA; LEFEBVRE, 2007). Nossos dados em conjunto com a literatura, demonstram a possibilidade de o domínio MATH ser um novo CRD, sendo essa uma função ainda não comprovada para esses domínios. Desse modo, todas as proteínas contendo o domínio MATH em sua estrutura, envolvidas nos processos de sinalização intracelular descritos, apresentariam a capacidade de reconhecer carboidratos, sendo proteína tipo lectina.

6 CONCLUSÃO

Diante do exposto, é possível concluir que a lectina BOL é capaz de ligar a superfície de linfócitos e macrófagos; capacidade esta que pode estar envolvida na indução de proliferação observada em esplenócitos estimulados com diferentes concentrações dessa lectina. Ainda, após a purificação, foi possível identificar potenciais ligantes dessa lectina. O sequenciamento proteico por MALDI/TOF relevou 4 potenciais proteínas ligantes, TF3C2, NEST, ELNF1 e FERL3. Análises *in silico* analisaram os possíveis sítios de glicosilação e acessibilidade da superfície proteica, indicando que as proteínas possuem sítios de glicosilação acessíveis na sua superfície, confirmando a possibilidade dessas proteínas serem glicoproteínas. Essas proteínas estão envolvidas em processos de sinalização intracelular, atuando como fatores de transcrição, proteínas de citoesqueleto ou reconhecimento de ligantes na membrana celular. O reconhecimento dessas proteínas pela BOL através da sua estrutura contendo apenas domínios MATH, indica a possível atuação desse domínio como um CRD, o que poderia revelar o envolvimento de proteínas tipo lectina e a participação dos carboidratos em vias de sinalização intracelular.

REFERÊNCIAS

- ACKERMAN, S. J. et al. Molecular cloning and characterization of human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase). Similarities to IgE binding proteins and the S-type animal lectin superfamily. **The Journal of Immunology**, v. 150, n. 2, p. 456–68, 15 jan. 1993.
- AKIVA, E. et al. A dynamic view of domain-motif interactions. **PLoS Computational Biology**, 2012.
- ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. Sixth edit ed. [s.l.] W. W. Norton & Company, 2014.
- ARMSTRONG, J. P. K.; PERRIMAN, A. W. Strategies for cell membrane functionalization. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 10, p. 1098–1106, 26 maio 2016.
- AUB, J. C.; SANFORD, B. H.; COTE, M. N. Studies on reactivity of tumor and normal cells to a wheat germ agglutinin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 54, n. 2, p. 396–399, 1 ago. 1965.
- BELL, G. Models for the specific adhesion of cells to cells. **Science**, v. 200, n. 4342, p. 618–627, 12 maio 1978.
- BENOIST, C.; MATHIS, D. Treg Cells, Life History, and Diversity. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 9, p. a007021–a007021, 1 set. 2012.
- BLASCO, E. et al. Proliferative response of human CD4+ T lymphocytes stimulated by the lectin jacalin. **European Journal of Immunology**, v. 25, n. 7, p. 2010–2018, jul. 1995.
- BONCHUK, A. et al. Drosophila BTB/POZ Domains of “ttk Group” Can Form Multimers and Selectively Interact with Each Other. **Journal of Molecular Biology**, v. 412, n. 3, p. 423–436, set. 2011.
- BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). **Science (New York, N.Y.)**, v. 119, n. 3091, p. 419, 1954.
- BRANTON, D.; DEAMER, D. W. Membrane Structure. In: **Membrane Structure**. Vienna: Springer Vienna, 1972. p. 1–70.
- BUMAH, V. V. et al. Optimization of the antimicrobial effect of blue light on methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in vitro. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 47, n. 3, p. 266–272, 2015.
- CALADO, D. P. et al. The cell-cycle regulator c-Myc is essential for the formation and maintenance of germinal centers. **Nature Immunology**, v. 13, n. 11, p. 1092–1100, nov. 2012.
- CAMPOS, J. K. L. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of Bauhinia

monandra leaf lectin. **Biochimie Open**, 2016.

CARVALHO, E. V. M. M. et al. Lectins as mitosis stimulating factors: Briefly reviewed. **Life Sciences**, v. 207, p. 152–157, 15 ago. 2018.

CASEY, P. Protein lipidation in cell signaling. **Science**, v. 268, n. 5208, p. 221–225, 14 abr. 1995.

CHEN, Z.; LAURENCE, A.; O'SHEA, J. J. Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation. **Seminars in Immunology**, v. 19, n. 6, p. 400–408, dez. 2007.

COLNOT, C. et al. Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-3-null mutant mice. **Immunology**, v. 94, n. 3, p. 290–296, 28 jul. 1998.

COLTRI, K. C. et al. Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. **American Journal of Pathology**, v. 173, n. 2, p. 423–432, ago. 2008.

CORIOLO, M. C. et al. *Rachycentron canadum* (cobia) Lectin Promoted Mitogenic Response in Mice BALB/c Splenocytes. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 76, n. 6, p. 567–572, dez. 2012.

COSSON, P. et al. RTM3, Which Controls Long-Distance Movement of Potyviruses, Is a Member of a New Plant Gene Family Encoding a Meprin and TRAF Homology Domain-Containing Protein. **Plant Physiology**, v. 154, n. 1, p. 222–232, set. 2010.

CROME, S. Q.; WANG, A. Y.; LEVINGS, M. K. Translational Mini-Review Series on Th17 Cells: Function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 159, n. 2, p. 109–119, fev. 2010.

DA SILVA, T. A. et al. Artinm mediates murine T cell activation and induces cell death in Jurkat human leukemic T cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, 1 jul. 2017.

DAVIES, E. L. et al. The transcriptional regulator *lola* is required for stem cell maintenance and germ cell differentiation in the *Drosophila* testis. **Developmental Biology**, v. 373, n. 2, p. 310–321, jan. 2013.

DAWSON, N. et al. The Classification of Protein Domains. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana Press Inc., 2017. v. 1525p. 137–164.

DE ALBORAN, I. M. et al. Analysis of c-Myc function in normal cells via conditional gene-targeted mutation. **Immunity**, v. 14, n. 1, p. 45–55, 2001.

DE SCHUTTER, K.; VAN DAMME, E. Protein-Carbohydrate Interactions as Part of Plant Defense and Animal Immunity. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 9029–9053, 19 maio 2015.

DÍAZ, C. L. et al. Sugar-binding activity of pea lectin expressed in white clover hairy roots. **Plant Physiol**, v. 109, p. 1167–1177, 1995.

DOLAN, J. et al. The extracellular Leucine-Rich Repeat superfamily; a comparative survey and analysis of evolutionary relationships and expression patterns. **BMC Genomics**, v. 8, n. 1, p. 320, 2007.

DUARTE, C. E. M. **Brassica Oleracea Lectin: Isolation, Characterization, and Functional Assessment of the First Lectin With MATH Domains**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2016.

DUARTE, C. E. M. et al. A new TRAF-like protein from *B. oleracea* ssp. *botrytis* with lectin activity and its effect on macrophages. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, n. Pt A, p. 508–514, jan. 2017.

DWEK, R. A. **Glycobiology: “Towards understanding the function of sugars”**. Biochemical Society Transactions. **Anais...**Portland Press Ltd, 1995

EHRlich, P. Croonian lecture.—On immunity with special reference to cell life. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 66, n. 424–433, p. 424–448, 31 dez. 1900.

EWART, K. V.; JOHNSON, S. C.; ROSS, N. W. Identification of a pathogen-binding lectin in salmon serum. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v. 123, n. 1, p. 9–15, maio 1999.

FAESEN, A. C.; SIXMA, T. K.; EVERETT, R. D. Ubiquitin-Specific Protease USP7. In: **Handbook of Proteolytic Enzymes**. [s.l.] Elsevier, 2013. v. 2p. 2057–2062.

FINN, R. D. et al. **Pfam: The protein families database****Nucleic Acids Research**, 2014.

FRANZ, H. The ricin story. **Adv. Lectin Res**, v. 1, p. 10–25, 1988.

FRISCH, S. M. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. **The Journal of Cell Biology**, v. 124, n. 4, p. 619–626, 1 fev. 1994.

FRISCH, S. M.; RUOSLAHTI, E. Integrins and anoikis. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, n. 5, p. 701–706, out. 1997.

FUJIMOTO, Z.; TATENO, H.; HIRABAYASHI, J. Lectin Structures: Classification Based on the 3-D Structures. In: **Methods in Molecular Biology**. New York: [s.n.]. v. 1200p. 579–606.

GANESHAN, K.; CHAWLA, A. Metabolic Regulation of Immune Responses. **Annual Review of Immunology**, v. 32, n. 1, p. 609–634, 21 mar. 2014.

GODT, D. et al. Pattern formation in the limbs of *Drosophila*: bric à brac is expressed in both a gradient and a wave-like pattern and is required for specification and proper segmentation of the tarsus. **Development**, v. 119, n. 3, p. 799–812, nov. 1993.

GOLDSTEIN, I. J. et al. What should be called a lectin? **Nature**, v. 285, n. 5760, p. 66–66, 8 maio 1980.

GUPTA, G. S. **Animal Lectins: Form, Function and Clinical Applications**. Vienna: Springer Vienna, 2012. v. 9783709110

GUPTA, R.; JUNG, E.; BRUNAK, S. **NetNGlyc: Prediction of N-glycosylation sites in human proteins**. [s.l.: s.n.].

HELLIN, H. **Der giftige Eiweisskörper Abrin und seine Wirkung auf das Blut**. [s.l.] Dopart, 1891.

HOLANDA, F. et al. Antinociceptive Activity of Lectins from Diocleinae Seeds on Acetic Acid-Induced Writhing Test in Mice. **Protein & Peptide Letters**, v. 16, n. 9, p. 1088–1092, 1 set. 2009.

HOLLOWATY, M. N. et al. Protein Interaction Domains of the Ubiquitin-specific Protease, USP7/HAUSP. **Journal of Biological Chemistry**, 2003.

HOWARD, I. K.; SAGE, H. J.; HORTON, C. B. Studies on the appearance and location of hemagglutinins from a common lentil during the life cycle of the plant. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 149, n. 1, p. 323–326, 1972.

HUBBARD, A. K.; ROTHLEIN, R. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression and cell signaling cascades. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 9, p. 1379–1386, 1 maio 2000.

HVIDSTEN, T. R. et al. A Comprehensive Analysis of the Structure-Function Relationship in Proteins Based on Local Structure Similarity. **PLoS ONE**, v. 4, n. 7, p. e6266, 15 jul. 2009.

ITAKURA, Y.; SASAKI, N.; TOYODA, M. Qualitative and quantitative alterations in intracellular and membrane glycoproteins maintain the balance between cellular senescence and human aging. **Aging**, v. 10, n. 8, p. 2190–2208, 29 ago. 2018.

JONES, S.; THORNTON, J. M. Principles of protein-protein interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 1, p. 13–20, 9 jan. 1996.

KILPATRICK, D. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1572, n. 2–3, p. 187–197, 19 set. 2002.

KIM, J.-J. et al. Antitumor Effect of KML-B-Treated Dendritic Cells via Induction of Lymphocyte Activation. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, p. 1–7, 2017.

KISHORE, U.; EGGLETON, P.; REID, K. B. M. Modular organization of carbohydrate recognition domains in animal lectins. **Matrix Biology**, 1997.

KOBE, B. The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 11, n. 6, p. 725–732, 1 dez. 2001.

- KRASNOVA, L.; WONG, C.-H. Understanding the Chemistry and Biology of Glycosylation with Glycan Synthesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 85, n. 1, p. 599–630, 2 jun. 2016.
- KUNDU, T. K.; WANG, Z.; ROEDER, R. G. Human TFIIC Relieves Chromatin-Mediated Repression of RNA Polymerase III Transcription and Contains an Intrinsic Histone Acetyltransferase Activity. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 2, p. 1605–1615, 1 fev. 1999.
- LABBÉ, R. M. et al. A Comparative transcriptomic analysis reveals conserved features of stem cell pluripotency in planarians and mammals. **Stem Cells**, 2012.
- LANCTOT, P. M.; GAGE, F. H.; VARKI, A. P. The glycans of stem cells. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 4, p. 373–380, ago. 2007.
- LEFFLER, H. et al. Introduction to galectins. **Glycoconjugate Journal**, v. 19, n. 7–9, p. 433–440, 2002.
- LEMMON, M. A. Membrane recognition by phospholipid-binding domains. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 99–111, fev. 2008.
- LI, M. et al. Deubiquitination of p53 by HAUSP is an important pathway for p53 stabilization. **Nature**, 2002.
- LIANG, Z. W. et al. Nestin-mediated cytoskeletal remodeling in endothelial cells: Novel mechanistic insight into VEGF-induced cell migration in angiogenesis. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, 2015.
- LIMA, H. C. et al. Induction and inhibition of human lymphocyte transformation by the lectin from the red marine alga *Amansia multifida*. **Journal of Applied Phycology**, v. 10, n. 2, p. 153–162, 1998.
- LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1572, n. 2–3, p. 198–208, 19 set. 2002.
- LU, L.; BARBI, J.; PAN, F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 11, p. 703–717, nov. 2017.
- MASON, C.; TARR, A. Human Lectins and Their Roles in Viral Infections. **Molecules**, v. 20, n. 2, p. 2229–2271, 29 jan. 2015.
- MITCHELL, C. A.; RAMESSAR, K.; O'KEEFE, B. R. **Antiviral lectins: Selective inhibitors of viral entry** *Antiviral Research*, 2017.
- MITCHELL, S. W. Researches upon the venom of the rattlesnake. **Smithson Contributions**, v. Knowl XII, 1860.
- MOKRÝ, J. et al. Expression of intermediate filament nestin in blood vessels of neural and non-neural tissues. **Acta medica (Hradec Králové) / Universitas Carolina, Facultas Medica Hradec Králové**, 2008.

- MOREMEN, K. W.; TIEMEYER, M.; NAIRN, A. V. Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 7, p. 448–462, 22 jul. 2012.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 1983.
- NANGIA-MAKKER, P. et al. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. **American Journal of Pathology**, 2000.
- NIZET, V.; VARKI, A.; AEBI, M. Microbial Lectins: Hemagglutinins, Adhesins, and Toxins. 2017.
- NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: An Initiator of Mitosis in Cultures of Normal Human Leukocytes. **Cancer Research**, 1960a.
- NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. **Cancer research**, v. 20, n. 4, p. 462–6, 1 maio 1960b.
- NURNBERGER, T. et al. Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. **Immunological Reviews**, v. 198, n. 1, p. 249–266, abr. 2004.
- OOI, L. S. M. et al. Narcissus tazetta lectin shows strong inhibitory effects against respiratory syncytial virus, influenza A (H1N1, H3N2, H5N1) and B viruses. **Journal of Biosciences**, v. 35, n. 1, p. 95–103, mar. 2010.
- ORENGO, C. A.; TODD, A. E.; THORNTON, J. M. From protein structure to function. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, n. 3, p. 374–382, 1999.
- PARK, Y. C. et al. A novel mechanism of TRAF signaling revealed by structural and functional analyses of the TRADD-TRAF2 interaction. **Cell**, 2000.
- PAWSON, T.; NASH, P. Protein-protein interactions define specificity in signal transduction. **Genes & development**, v. 14, n. 9, p. 1027–47, 1 maio 2000.
- PÉREZ-OLIVARES, M. et al. Functional interplay between c-Myc and Max in B lymphocyte differentiation. **EMBO reports**, v. 19, n. 10, 20 out. 2018.
- PERILLO, N. L. et al. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. **Nature**, 1995.
- PETERSEN, B. et al. A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. **BMC Structural Biology**, 2009.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. Lectins as Plant Defense Proteins. **Plant Physiology**, v. 109, n. 2, p. 347–352, 1995.
- PEUMANS WILLY J.; STINISSEN, H. M. Gramineae lectins: occurrence, molecular biology and physiological function. In: GOLDSTEIN, I. J.; ETZLER, M. E. (Eds.). . **Chemical Taxonomy, Molecular Biology, and Function of Plant Lectins**. [s.l.] New York, 1983. v. 138p. 99–116.

PINEAU, N. et al. Jacalin: a lectin mitogenic for human CD4 T lymphocytes. **Clinical and experimental immunology**, v. 80, n. 3, p. 420–5, jun. 1990.

PINTO, N. V. et al. Effects of canavalia lectins on acute inflammation in sensitized and non-sensitized rats. **Inflammation**, 2013.

PIRES, W. L. et al. Lectin isolated from Bothrops jararacussu venom induces IL-10 release by TCD4 + cells and TNF- α release by monocytes and natural killer cells. **Journal of Leukocyte Biology**, 1 set. 2019.

PONTING, C. P.; RUSSELL, R. R. The Natural History of Protein Domains. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 31, n. 1, p. 45–71, jun. 2002.

RUAS, L. P. et al. Lack of Galectin-3 Drives Response to *Paracoccidioides brasiliensis* toward a Th2-Biased Immunity. **PLoS ONE**, v. 4, n. 2, p. e4519, 20 fev. 2009.

RÜDIGER, H.; GABIUS, H. J. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate journal**, v. 18, n. 8, p. 589–613, ago. 2001.

SCHLESSINGER, J. Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases. **Cell**, v. 103, n. 2, p. 211–225, out. 2000.

SCHRAMM, L. Recruitment of RNA polymerase III to its target promoters. **Genes & Development**, v. 16, n. 20, p. 2593–2620, 15 out. 2002.

SHARON, N. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R-62R, 30 jun. 2004a.

SHARON, N. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R-62R, 30 jun. 2004b.

SHARON, N.; LIS, H. **Lectins**. New York: Chapman and Hall. London., 1989.

SONG, S. et al. Overexpressed galectin-3 in pancreatic cancer induces cell proliferation and invasion by binding ras and activating ras signaling. **PLoS ONE**, 2012.

STANAWAY, S. E. R. S.; GILL, G. V. Protein glycosylation in diabetes mellitus: biochemical and clinical considerations. **Practical Diabetes International**, v. 17, n. 1, p. 21–25, jan. 2000.

STEENTOFT, C. et al. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. **EMBO Journal**, v. 32, n. 10, p. 1478–1488, 2013.

STELA, P. et al. Cratylia mollis 1, 4 Lectin: A New Biotechnological Tool in IL-6, IL-17A, IL-22, and IL-23 Induction and Generation of Immunological Memory. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

STOJANOVIĆ, M. M. et al. In vitro stimulation of Balb/c and C57 BL/6 splenocytes by

a recombinantly produced banana lectin isoform results in both a proliferation of T cells and an increased secretion of interferon-gamma. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 1, p. 120–129, jan. 2010.

SUN, X. et al. Flow cytometric analysis of T lymphocyte proliferation in vivo by EdU incorporation. **International Immunopharmacology**, 2016.

SUNNERHAGEN, M.; PURSGLOVE, S.; FLADVAD, M. The new MATH: Homology suggests shared binding surfaces in meprin tetramers and TRAF trimers. **FEBS Letters**, 2002.

TANIGUCHI, N. et al. Decoding sugar functions by identifying target glycoproteins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 16, n. 5, p. 561–566, out. 2006.

TARBELL, J. M.; SIMON, S. I.; CURRY, F.-R. E. Mechanosensing at the Vascular Interface. **Annual Review of Biomedical Engineering**, 2014.

TOYODA, M. et al. Lectin microarray analysis of pluripotent and multipotent stem cells. **Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms**, v. 16, n. 1, p. 1–11, jan. 2011.

VAN DAMME, E. J. M. et al. **Handbook of plant lectins : properties and biomedical applications**. [s.l.] Wiley, 1998.

VARKI, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. **Glycobiology**, v. 3, n. 2, p. 97–130, abr. 1993.

VARKI, A. et al. S-type Lectins (Galectins). 1999.

VARKI, A. et al. Glycosylation Changes in Cancer. 2017.

VARROT, A.; BASHEER, S. M.; IMBERTY, A. Fungal lectins: structure, function and potential applications. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 23, n. 5, p. 678–685, out. 2013.

WADA, J. et al. Developmental regulation, expression, and apoptotic potential of galectin-9, a β -galactoside binding lectin. **Journal of Clinical Investigation**, 1997.

WECKSLER, M.; LEVY, A.; JAFFÉ, W. G. [Mitogenic effects of extracts of *Canavalia ensiformis* and *Concanavalina A*]. **Acta científica venezolana**, v. 19, n. 4, p. 154–6, 1968.

WHITE, R. J. **RNA Polymerase III Transcription**. 2nd. ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1998.

WILLOUGHBY, J. E. et al. Raf Signaling but not the ERK Effector SAP-1 Is Required for Regulatory T Cell Development. **The Journal of Immunology**, 2007.

WINTER, A. G. et al. RNA polymerase III transcription factor TFIIIC2 is overexpressed in ovarian tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 23, p. 12619–12624, 7 nov.

2000.

WU, A. M. et al. **Lectins as tools in glycoconjugate research** *Glycoconjugate Journal*, nov. 2009.

YANG, R. Y.; HSU, D. K.; LIU, F. T. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 1996.

YIN, Q. et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factors in immune receptor signal Transduction. In: **Handbook of Cell Signaling, 2/e**. [s.l.] Elsevier Inc., 2010. v. 1p. 339–345.

ZAPATA, J. M. et al. A Diverse Family of Proteins Containing Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factor Domains. **Journal of Biological Chemistry**, 2001.

ZAPATA, J. M.; MARTÍNEZ-GARCÍA, V.; LEFEBVRE, S. Phylogeny of the TRAF/MATH Domain. In: **TNF Receptor Associated Factors (TRAFs)**. New York, NY: Springer New York, 2007. v. 597p. 1–24.

ZHAO, N. et al. Mannan-binding lectin, a serum collectin, suppresses T-cell proliferation via direct interaction with cell surface calreticulin and inhibition of proximal T-cell receptor signaling. **The FASEB Journal**, v. 31, n. 6, p. 2405–2417, jun. 2017.

ZHAO, Y.-Y. et al. Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer. **Cancer Science**, v. 99, n. 7, p. 1304–1310, jul. 2008.

ZURIAGA, E. et al. Genomic analysis reveals MATH gene(s) as candidate(s) for Plum pox virus (PPV) resistance in apricot (*Prunus armeniaca*L.). **Molecular Plant Pathology**, 2013.