

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

FLÁVIO DE OLIVEIRA SILVA

**Atividade moduladora da lectina isolada das sementes de
*Canavalia brasiliensis***

Recife

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIÊNCIA ANIMAL

FLÁVIO DE OLIVEIRA SILVA

Atividade moduladora da lectina isolada das sementes de
Canavalia brasiliensis

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

Orientação: Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Co-orientação: Profa. Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira
Profa. Dra. Cristiane Moutinho Lagos de Melo.

Recife

2012

Ficha catalográfica

S586a Silva, Flávio de Oliveira
Atividade moduladora da lectina isolada das sementes de
Canavalia brasiliensis / Flávio de Oliveira Silva. -- Recife,
2012.
110 f. : il.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto.
Tese (Doutorado em Biociência Animal) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia
e Fisiologia Animal, Recife, 2012.
Inclui referências e anexo.

1. Atividade proliferativa 2. *Canavalia brasiliensis*
3. ConBr 4. Lectinas 5. Lectinas ligadoras de
glicose/manose I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo, orientadora
II. Título

CDD 636.089

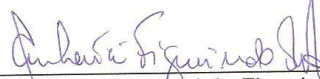
FLÁVIO DE OLIVEIRA SILVA

**Atividade moduladora da lectina isolada das sementes de *Canavalia
brasilensis***

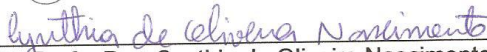
Tese apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal.

Aprovado em ___/___/___

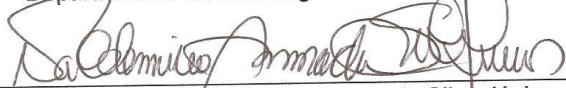
BANCA EXAMINADORA



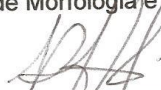
Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal/UFRPE



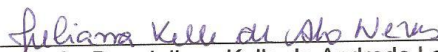
Profa. Dra. Cynthia de Oliveira Nascimento
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal/UFRPE



Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal/UFRPE



Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior
Departamento de Patologia/UFPE



Profa. Dra. Juliana Kelle de Andrade Lemoine Neves
Laboratório de Imunogenética – CpqAM/FIOCRUZ

“À minha mãe, Aurenice de Oliveira Silva e *in memoriam* à minha avó, Bevenuta Marques de Oliveira, pois, sem o empenho delas eu não teria dado os primeiros passos, esses sim, foram fundamentais para que eu estivesse vivendo agora esse momento.”

AGRADECIMENTOS

À Deus sobre todas as coisas por ter permitido que eu vivesse essa experiência, por ter me dado a força necessária pra continuar nos momentos difíceis e ter colocado as pessoas certas em meu caminho desde que eu decidi que viveria essa etapa nessa vida.

À minha família, meus irmãos, Edilson Júnior, Karla, Patrícia, Victória, minha mãe Nice e minha sobrinha Lavínia, que são as pessoas pelas quais eu continuo tentando e tentando.

À Edeilson Vicente Ferreira pela paciência e apoio durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Giuliana Viegas Schirato, pela amizade, e pela força nas horas difíceis e pelo incentivo.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto, por ter acreditado na minha capacidade para desenvolver esse projeto.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira, por ter fornecido as condições técnicas para que essa pesquisa fosse realizada.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Cristiane Moutinho Lagos de Melo, por toda a dedicação, apoio científico e moral. Por ter se esforçado até os últimos minutos para a realização deste trabalho. Por ter estado ao meu lado no dia a dia dessa pesquisa dando todo suporte necessário e ter contribuído para que tivéssemos um ambiente de trabalho agradável.

Aos professores participantes da banca examinadora, Profa. Dra. Cynthia de Oliveira Nascimento, Profa. Dra. Juliana Kelle de Andrade Lemoine Neves, Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior e Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior, pela disponibilidade em participar da avaliação desta tese e pelas contribuições para a melhoria dela.

À Priscila das Neves Santos, obrigado Pri por sua amizade, por todo o apoio técnico e emocional, por ter escutado as lamentações e pelos bons momentos que dividimos trabalhando juntos.

À Evelynne Figueirôa, pela ajuda técnica, pelas discussões científicas e pelos bons momentos.

Aos amigos Albery Lins, Cristina Bernardino, Edilson Reis, Eliane Glaúlia, Iracema França, Josely Carmem, Sandro Sales e Silvânia Abdias, por deixarem os meus dias chuvosos mais ensolarados.

Às pessoas com as quais convivi durante esse tempo e que sempre passaram energias positivas pra mim, Amanda Sales, Germana Michele, Gisele Dias, Eliana Passos, Fabiana América, Ítala Mesquita, Maria da Conceição Gomes, Mariana Arruda, Marília Coriolano, Marília Sales, Milena e Tatiana Barros.

À Cynthia Oliveira, Polyanna Herculano e Raquel Pedrosa, pelo socorro e ajuda nas horas em que precisei.

À Edna Chérias, secretária do Programa de Pós Graduação em Biociência Animal, pela atenção, pelos esclarecimentos e pela boa vontade em ajudar me sempre que precisei.

Aos colegas da primeira turma do curso de Biociência Animal, Fernanda Borba, Fernanda Chagas, Edberghe, Maria Helena, Marliete, Roberto Afonso, Vilma Sobral, pelo companherismo durante as aulas e na execução dos trabalhos.

Às amigas de sempre que estão comigo desde a época de graduação Flávia Maia, Maria Helena Gama, Luciana Neves, Milly Lílian e Rejane Luna.

A todos que fazem parte do Labtecbio, e que contribuem para que tenhamos um ambiente favorável de trabalho.

A todos, os meus sinceros agradecimentos.

Graças a Deus

RESUMO

As lectinas são proteínas que apresentam a capacidade de se ligar de maneira específica e reversível a carboidratos, exibindo distintos efeitos biológicos. Neste trabalho, realizou-se uma revisão de literatura sobre os efeitos biológicos da lectina extraída das sementes da *Canavalia brasiliensis* (ConBr), uma planta presente no Nordeste e Sul do Brasil, que é conhecida popularmente como feijão bravo do Ceará. Além disso, realizou-se um estudo para analisar a atividade moduladora da ConBr sobre esplenócitos murinos, verificando-se sua ação sobre a proliferação e viabilidade celular, produção de citocinas e óxido nítrico (NO). Realizou-se também, um estudo para avaliar o efeito da ConBr sobre células B16F10 de melanoma murino, analisando-se a inibição da proliferação e migração celular, bem como a indução de apoptose e síntese de citocinas e NO. Os resultados demonstraram que a ConBr induziu nas concentrações de 2.5, 5.0 e 10 µg/ml promoveu a proliferação de esplenócitos, com alto índice de viabilidade celular. Além disso, a concentração de 10 µg/ml induziu a produção de citocinas e óxido nítrico. Em células B16F10 de melanoma murino, observou-se que a ConBr inibiu a proliferação das células tumorais promovendo apoptose celular. Verificou-se ainda, a produção de óxido nítrico e da citocina IL-12 pelas células submetidas ao estímulo. A lectina ConBr possui um potencial uso biotecnológico como mitógeno e agente antitumoral.

Palavras – chave: atividade proliferativa, *Canavalia brasiliensis*, lectinas, lectinas ligadoras de glicose/manose,

ABSTRACT

Lectins are proteins that bind specifically and reversibly to carbohydrates, showing several biological effects. In this work, we carried out a literature review about biological effects of lectin extracted from seeds of *Canavalia brasiliensis* (ConBr), a plant present in the northeastern and southern Brazil, which is popularly known as wild bean of Ceará. In addition, we carried out a study to analyze the modulating activity of ConBr on murine splenocytes, verifying its effect on cell viability and proliferation, cytokine and nitric oxide (NO) production. We have also performed a study to evaluate ConBr effect on B16F10 murine melanoma cells by analyzing the inhibition of cell proliferation and migration as well as apoptosis induction and synthesis of cytokines and NO. The results show that ConBr induced at concentrations of 2.5, 5.0 and 10 $\mu\text{g/ml}$ promoted the proliferation of splenocytes, with high cell viability. Furthermore, the concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$ induced cytokine production and nitric oxide on B16F10 murine melanoma, it was observed that ConBr inhibited tumor cell proliferation inducing apoptosis. It was also observed nitric oxide and IL-12 production by B16F10 cells under stimulus. ConBr lectin possesses a biotechnological potential use as a mitogen and anti-tumor agent.

Keywords: *Canavalia brasiliensis*, ConBr, lectins, glucose/mannose binding-lectin, proliferative activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação das lectinas vegetais de acordo com a estrutura geral.....21

Figura 2. α -metilmanose no sítio ligador da ConA. As interações hidrofóbicas são indicadas pelas linhas amarelas, as interações eletrostáticas e pontes de hidrogênio são ilustradas pelas linhas vermelhas (Neumann et al., 2004).....24

Figura 3. Visão geral da *Canavalia brasiliensis*.....26

Figura 4. Distribuição geográfica da *Canavalia brasiliensis*.....27

Figura 5. Sementes da *Canavalia brasiliensis*.....28

Artigo 1

Fig. 1 Splenocytes proliferation. Murine splenocytes (10^6 cells/ml) were stimulated by ConBr (2.5–10 $\mu\text{g/ml}$) and ConA (2.5 $\mu\text{g/ml}$) for 72 h at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 . Non-stimulated splenocytes cultured under the same conditions were used as a control. Increases in cell number were measured using the [3H]-thymidine assay method. Values represent the mean \pm SD of three replicates. Statistical analysis was done using the Prism 5.0 software. Differences were considered significant at $p < 0.05$ as compared to the control.....62

Fig. 2 IL-2 production in cell cultures. Cells cultured, *in vitro*, with ConBr and ConA lectins at 24 h, 48 h, 72 h, and 6 days, respectively. ConBr induced higher IL-2 production at all experimental times relative to control cultures, and at 48 and 72 h as compared to ConA stimulated cultures. Values represent the mean \pm SD of six independent experiments per group. Differences were considered significant at $p < 0.05$ as compared to control values.....63

Fig. 3 IL-6 production in cells cultured with ConBr and ConA stimuli. Cells cultured, *in vitro*, with ConBr and ConA lectins at 24 h, 48 h, 72 h, and 6 days, respectively. Higher IL-6 production was observed for both lectins relative to the control at all experimental times. ConA produced higher IL-6 as compared to ConBr at 48 h. Values represent the mean \pm SD of six independent experiments per group. Differences were considered significant at $p < 0.05$ as compared to control values.....64

Fig. 4 IFN- γ production in splenocytes cultivated with ConBr and ConA stimuli. Cells cultured, *in vitro*, with ConBr and ConA lectins at 24 h, 48 h, 72 h, and 6 days, respectively. Non-stimulated splenocytes cultured under the same conditions were used as the controls. ConBr and ConA stimuli produced similar levels of IFN- γ in all experimental groups and produced significantly higher IFN- γ as compared to control cultures. Only at 24 h did ConBr produce higher levels of IFN- γ as compared to ConA. Values represent the mean \pm SD of six independent experiments per group. Differences were considered significant at $p < 0.05$ as compared to control values.....65

Fig. 5 IL-10 production in cells cultured with ConBr and ConA stimuli. Cells cultured, *in vitro*, with ConBr and ConA lectins at 24 h, 48 h, 72 h, and 6 days, respectively. ConA produced significantly higher IL-10 as compared to control values after 24 h and 6 days of culture. ConBr also induced higher IL-10 production and was superior to control and ConA cultures at 48 and 72 h. Values represent the mean \pm SD of six independent experiments per group. Differences were considered significant at $p < 0.05$ as compared to controls.....66

Fig. 6 NO production in Balb/c splenocytes treated with ConBr and ConA lectins. Splenocytes (10^6 cells/ml) were stimulated by ConA (2.5 $\mu\text{g/ml}$) and ConBr (2.5–10 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h, 48 h, 72 h, and 6 days. Non-stimulated cells were used as negative controls. Supernatants were collected, and the nitrite (NO) concentration from the supernatants was determined using the Griess reagent as described in the Materials and Methods. Data represent the means \pm SD of two independent observations performed in triplicate. Differences were considered significant at $p < 0.05$ as compared to the ConA positive control and negative control groups.....67

Fig. 7 The effect of lectins on splenocyte viability. **A**—cell death at 24 hours. ConBr and ConA induced increased apoptosis and late apoptosis as compared to the control. At the same time, ConA induced higher rates of necrosis as compared to ConBr and the control. **B**—cell death at 48 hours. ConBr induced increased apoptosis as compared to the control, late apoptosis as compared to the control and ConA, and necrosis only with

respect to ConA, and not the control, at 48 hours. At the same time, ConA induced higher levels of necrosis as compared to the control. Values represent the mean \pm SD of five independent experiments per group. Differences were considered significant at $p < 0.05$ as compared to the controls.....68

Artigo 3

Fig. 1 Effect of ConBr on the proliferation of murine melanoma B16F10 cells. Inhibition of proliferation was calculated according to materials and methods with data obtained from quadruplicate experiments. Cells (3×10^5) were treated with different ConBr concentrations at 24 h (A) and 48 h (B).....99

Fig. 2 The apoptotic ConBr effect on murine melanoma B16F10 cells at 24 h (A) and 48 h (B). Murine melanoma B16F10 cells (5×10^5 cells/ml) were treated with different ConBr concentrations. Induction of B16F10 cell death was characterized by apoptosis. ConBr A induced increased apoptosis and late apoptosis as compared to the control.....100

Fig. 3 Effects of ConBr on cell migration in B16-F10 cells. B16-F10 cells (10^6) were treated with ConBr (0, 2.5, 5.0, 10, 25, 50, and 100 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h. Cell migration was determined by cell migration assay. The plates were photographed at 0 and 24 h post-wounding, and were determined by quantifying the relative proportion wounded at time zero.....101

Fig. 4 NO production in murine melanoma B16F10 cells with ConBr. Cells (5×10^5 cells/ml) were stimulated by ConBr (2.5, 5.0, 10, 25, and 50 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h and 48 h (A

and B respectively). Non-stimulated cells were used as negative controls. Supernatants were collected, and the nitrite (NO) concentration from the supernatants was determined using the Griess reagent as described in the Materials and Methods. Data represent the means \pm SD of two independent observations performed in triplicate. Differences were considered significant at $p < 0.05$ as compared to the ConA positive control and negative control groups.....102

Fig. 5 IL-12 production in murine melanoma B16F10 cells with ConBr. Cells (5×10^5 cells/ml) were stimulated by ConBr (2.5, 5.0, 10, 25, and 50 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h and 48 h (A and B respectively). Non-stimulated cells were used as negative controls. Supernatants were collected, and the IL-12 concentration from the supernatants was determined using an enzyme-linked immunosorbent assay from Kit OptEIA (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Data represent the means \pm SD of two independent observations performed in triplicate. Differences were considered significant at $p < 0.05$ as compared to the ConA positive control and negative control groups.....103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das lectinas vegetais.....23

Tabela 2. Principais citocinas, suas funções e implicações terapêuticas.....33

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
OBJETIVOS.....	20
OBJETIVO GERAL	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
1. REVISÃO DE LITERATURA	21
1.1 <i>Um breve histórico sobre as hemaglutininas</i>	21
1.2 <i>Classificação das lectinas vegetais</i>	22
1.2.1 <i>Classificação das lectinas quanto à estrutura da molécula</i>	22
1.4 <i>Leguminosas como fonte de lectinas</i>	27
1.5 <i>A lectina da <i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr)</i>	28
1.6 <i>Respostas celulares desencadeadas pelas lectinas vegetais</i>	30
1.6.1 <i>Efeito das lectinas vegetais sobre linfócitos</i>	30
1.6.2 <i>Lectinas como moduladores dos macrófagos</i>	31
1.6.3 <i>Migração de leucócitos induzida por lectinas de plantas</i>	32
1.6.4 <i>A interação entre células e lectinas promove a liberação de citocinas</i>	33
1.6.5 <i>Lectinas promovem apoptose celular por meio diferentes mecanismos</i>	36
2. REFERÊNCIAS.....	38
3. CAPÍTULO 1: Immunostimulatory activity of ConBr: A focus on splenocyte proliferation and proliferative cytokine secretion	45
4. CAPÍTULO 2: Atividades biológicas da ConBr, a lectina extraída das sementes da <i>Canavalia brasiliensis</i> Mart. ex. Benth.....	71
5. CAPÍTULO 3: Antiproliferative effect induced by ConBr lectin on B16F10 cells	86
6. CONCLUSÕES	106
7. ANEXOS	107

INTRODUÇÃO

Imunomoduladores são agentes capazes de modificar a resposta imune, podendo o efeito ser estimulatório ou inibitório. Os agentes estimulantes ou adjuvantes imunes, além de serem capazes de restaurar a resposta imune normal, estimulam o estado imunológico dos indivíduos susceptíveis a invasões por agentes devido a fatores ambientais (DUTTA, 2002). Uma variedade de substâncias, como polissacarídeos, lectinas, peptídeos, saponinas, óleos e outras oriundas de plantas são capazes de estimular o sistema imune, apresentando atividade imunomoduladora (LIMA, 2007).

As proteínas bioativas, incluindo as lectinas, podem constituir-se em um importante agente imunomodulador e antitumoral (GONZÁLEZ DE MEJÍA e PRISECARU, 2005). Lectinas são proteínas ou glicoproteínas que possuem a habilidade de se ligar especificamente a mono ou oligossacarídeos de forma reversível (HONG et al., 2001), constituindo um grupo heterogêneo de proteínas de origem não imunológica, de distribuição ubíqua na natureza (SHARON e LIS, 2001). Entre as atividades biológicas das lectinas, incluem-se aglutinação celular, apoptose, mitose, toxicidade e inibição do crescimento celular. Algumas lectinas têm demonstrado induzir a apoptose, o que poderia explicar sua citotoxicidade (KOYAMA et al., 2002).

Várias lectinas têm demonstrado possuir atividade imunomoduladora e antitumoral *in vivo* e *in vitro*; elas têm sido utilizadas como agentes terapêuticos, sendo capazes de se ligar a membrana celular ou seus receptores, causando citotoxicidade, apoptose e inibição do crescimento tumoral (GONZÁLEZ DE MEJÍA e PRISECARU, 2005).

A ConBr, lectina extraída das sementes da *Canavalia brasiliensis* tem especificidade para D-glicose/D-manose, tendo sido isolada pela primeira vez por Moreira e Cavada (1984). Esta lectina tem sido utilizada em diferentes modelos biológicos demonstrando efeitos moduladores sobre diferentes tipos celulares como linfócitos (BARRA-NETTO et al., 1992; BARBOSA et al., 2001), macrófagos (RODRIGUEZ et al., 1992), mastócitos (GOMES et al., 1994), células peritoneais (ANDRADE et al., 1999) e esplenócitos (SILVA et al., 2011).

Os produtos naturais são uma importante fonte de possíveis agentes com potencial terapêutico, sendo uma alternativa para a busca de novas substâncias com propriedades farmacológicas. Entre as moléculas com possível atividade imunomoduladora, destacam-se as lectinas, que são proteínas que têm demonstrado diversas atividades biológicas, sendo capazes de estimular o sistema imune e conseqüentemente, constituindo-se numa importante fonte para a pesquisa de novos agentes terapêuticos, por isso, objetivou-se com este estudo avaliar a atividade moduladora da lectina extraída a partir das sementes de *Canavalia brasiliensis in vitro* sobre esplenócitos e células B16F10 de melanoma murino.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Avaliar a atividade moduladora da lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) frente à esplenócitos murinos e células B16F10 de melanoma murino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar *in vitro* a atividade moduladora da ConBr, através da proliferação e viabilidade celular em esplenócitos murinos;
- Estabelecer o perfil de citocinas relacionadas a atividade proliferativa induzida pela ConBr;
- Avaliar a produção de óxido nítrico induzida pela lectina ConBr;
- Analisar o efeito da ConBr sobre células B16F10 de melanoma murino por meio da proliferação e apoptose celular, bem como da produção de citocinas e óxido nítrico.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 *Um breve histórico sobre as hemaglutininas*

O estudo de proteínas que possuem a capacidade de aglutinar eritrócitos teve início no final do século XIX. A primeira descrição de uma proteína com atividade hemaglutinante foi feita por Peter Stillmark em 1888, ao isolar uma proteína com atividade hemaglutinante das sementes de *Ricinus communis*, a ricina. Posteriormente, H. Hellin demonstrou a presença de uma hemaglutinina tóxica, a abrina, em extratos das sementes de *Abrus precatorius* (SHARON e LIS, 2004).

Em 1908, Landsteiner e Raubitishek identificaram diferenças nas atividades hemaglutinantes de vários extratos de sementes, frente a hemácias de diversas espécies, evidenciando a seletividade das aglutininas vegetais. A especificidade das fitohemaglutininas para diferentes grupos sangüíneos foi descrita por Renkonen (1948), Boyd e Requera (1949), Watkins e Morgan (1952) e Morgan e Watkins (1953). Estes estudos contribuíram para o estabelecimento das bases químicas das substâncias que caracterizam os grupos sangüíneos do sistema ABO (SELL e COSTA, 2000).

Em 1936, Sumner e Howell sugeriram pela primeira vez que a aglutinação dos eritrócitos produzida pela Concanavalina A (ConA), a lectina extraída da *Canavalia ensiformis*, seria devido a interações entre ela e açúcares presentes na superfície das hemácias, estabelecendo a principal propriedade das lectinas, a afinidade por carboidratos.

O termo “lectina” tem origem do latim “legere”, que significa “para selecionar”, e foi proposto por William Boyd em 1954. Atualmente, as proteínas que têm a capacidade de aglutinar as células vermelhas do sangue são conhecidas como “lectinas”. O nome “hemaglutininas” é usado quando a especificidade do açúcar é desconhecida. Lectinas e hemaglutininas são proteínas/glicoproteínas que possuem pelo menos um sítio não catalítico que se liga de maneira específica e reversível a mono ou oligossacarídeos específicos sem alterar as propriedades dos carboidratos (LAM e NG, 2011).

As lectinas são amplamente distribuídas na natureza, estando presentes em animais, plantas e microrganismos, e têm atraído grande interesse devido as várias

atividades biológicas que apresentam, como aglutinação celular, atividade antitumoral, imunomodulatória, antifúngica, antiviral e inseticida (PENG et al., 2009).

No reino vegetal, as sementes de leguminosas são a sua principal fonte, constituindo de 2 a 10% do total de proteínas das sementes (DIAZ et al., 1999), porém elas são abundantes também em outros tecidos da planta como: raiz, folha, frutas, flores e casca (RATANAPO et al., 2001).

A aplicabilidade das lectinas oferece muitas vantagens, considerando sua alta estabilidade e suas distintas especificidades, o que possibilita seu uso como uma importante ferramenta tanto para propósito analítico como preparativos em bioquímica, biologia celular, imunologia e áreas correlatas. O uso das lectinas em áreas clínicas e na agricultura também teve um desenvolvimento significativo. O emprego de lectinas como ferramentas biotecnológicas tem sido cada vez mais ampliado, indo desde reagentes no isolamento de substâncias contendo açúcares como biofatores e em bioensaios (SHARON & LIS, 2004).

1.2 Classificação das lectinas vegetais

Entre as classificações propostas para as lectinas vegetais, destacam-se as relacionadas à estrutura da molécula e a interação destas proteínas com carboidratos.

1.2.1 Classificação das lectinas quanto à estrutura da molécula

Van Damme et al. (2008) classificaram as lectinas em quatro grupos principais: em quatro grupos: merolectinas, hololectinas, superlectinas e quimerolectias.

As merolectinas são proteínas que possuem apenas um sítio ligador de carboidrato. Devido a sua natureza monovalente, este grupo de lectinas não promove a aglutinação celular.

As hololectinas são lectinas compostas por dois ou mais sítios de ligação a carboidratos idênticos ou com alta homologia o que as tornam capazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados. A maioria das lectinas de plantas isoladas e caracterizadas pertencem a este grupo de lectinas. Em contraste ao grupo das

hololectinas, as superlectinas são compostas por pelo menos dois sítios que se ligam a diferentes carboidratos.

As quimerolectinas são um grupo de lectinas constituído por um ou mais domínios de ligação a carboidratos e um domínio de função distinta, capaz de agir de forma independente dos sítios de ligação a carboidratos.

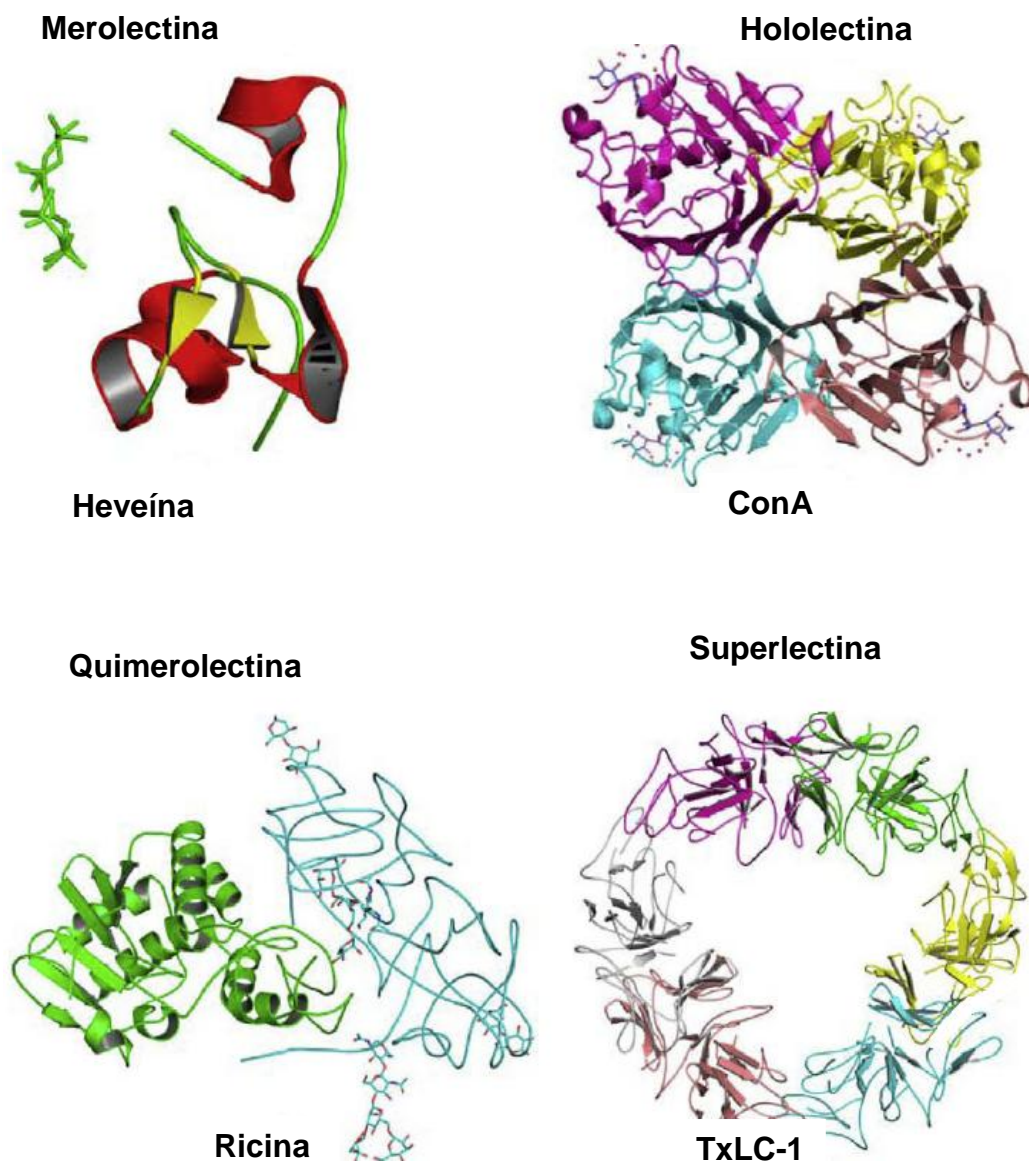


Figura 1. Representação das lectinas vegetais de acordo com a estrutura geral.

Inicialmente essa classificação foi feita, em quatro grupos, abrangendo significativamente inúmeras proteínas vegetais. Entretanto algumas lectinas de plantas, hoje descobertas e estruturalmente resolvidas, não se enquadram especificamente em nenhuma destas classificações. Como exemplo podemos citar a lectina presente na semente de *Parkia platycephala*, homóloga a família das hidrolases. Tal lectina possui um domínio com capacidade de reagir enzimaticamente com o polissacarídeo composto de monômeros de N-acetyl-D-glucosamina (quitina) e, ao mesmo tempo, dentro deste mesmo domínio, possui um outro sítio de reconhecimento a carboidrato (CAVADA et al., 2006).

1.2.2 Quanto ao sítio ligador de carboidratos

As lectinas são agrupadas de diversas maneiras, de acordo com suas propriedades em comum. Algumas lectinas exibem dupla especificidade, combinando-se simultaneamente com diferentes açúcares. Por essa razão, essas proteínas são classificadas dentro do mesmo grupo. Algumas lectinas interagem com monossacarídeos de diferentes grupos de especificidade por meio do mesmo sítio ligante (VAN DAMME et al., 2008).

De acordo com a especificidade de ligação a carboidratos, as lectinas podem ser classificadas em mono-específicas ou poliespecíficas, quando se ligam a um ou mais carboidratos, respectivamente. Baseado nessa classificação, as lectinas podem ser divididas em: lectinas ligadoras de manose, manose/glicose, manose/maltose, galactose/N-acetilgalactosamina, N-acetilgalactosamina/(N-acetilgalactosamina)_n, fucose e ácido siálico (BUTERA et al., 2007).

Com o progresso da análise estrutural de lectinas e da clonagem dos genes que as codificam, obteve-se o sequenciamento de lectinas vegetais. A análise destas sequências permitiu a distinção de doze famílias de acordo com suas especificidades a carboidratos: aglutinina homóloga de *Agaricus bisporus*, amarantinas, homólogos de quitinase classe V, família cianovirina, família *Euonymus europaeus*, proteínas com domínio de heveína, jacalina, família das leguminosas, domínios motivo de lisina, família *Nicotiana tabacu* e família ricina-B (Fu et al., 2011).

Tabela 1. Classificação das lectinas vegetais em famílias

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

Fonte: Fu et al., 2011.

1.3 A interação entre lectinas e carboidratos resulta em diferentes efeitos biológicos

As lectinas de plantas são importantes ferramentas em Glicobiologia e Glicobioquímica devido à multiplicidade de eventos que se pode conhecer em função da habilidade de se ligarem a carboidratos. As lectinas têm sido utilizadas na investigação estrutural e funcional de carboidratos complexos, glicoproteínas e para identificar mudanças decorrentes de processos fisiológicos e patológicos na superfície celular. Portanto, o desenvolvimento da Glicociência sempre esteve atrelado às pesquisas com lectinas (RÜDIGER et al., 2000; GABIUS et al., 2002).

O reconhecimento entre proteínas e carboidratos é fundamental em muitos processos biológicos, tais como infecções virais, bacterianas e parasitárias, separação de células e componentes solúveis, fertilização, crescimento, diferenciação e metástase do câncer. As lectinas são o modelo de escolha para o estudo da base molecular destes eventos de reconhecimento devido a seletividade e especificidade que apresentam para carboidratos, apesar de possuírem regiões estruturais altamente conservadas (LORIS et al., 1998).

Embora muitas lectinas reconheçam e se liguem a açúcares simples tais como glicose, manose, galactose, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina ou fucose, a afinidade é muito maior para com os constituintes de glicoproteínas: ácido siálico e N-acetilgalactosamina contendo cadeias de glicanos, encontrados em animais e seres humanos (PEUMANS e VAN DAMME, 1996).

Devido à interação específica das lectinas com os glicoconjugados, seja em solução ou na superfície celular, essas proteínas apresentam atividades biológicas diversas, como: adesão celular, interações célula matriz, apoptose celular e citotoxicidade em células e organismos (DANGUY et al., 2002).

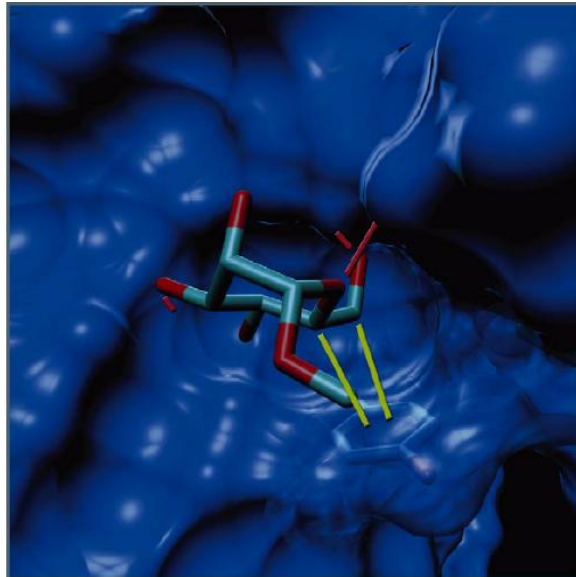


Figura 2. Ligação entre a α -metilmanose e o sítio ligador da ConA. As interações hidrofóbicas são indicadas pelas linhas amarelas, as interações eletrostáticas e pontes de hidrogênio são ilustradas pelas linhas vermelhas (NEUMANN et al., 2004).

As propriedades químicas e biológicas relatadas até o momento tomam como referência a ligação lectina-açúcar e um fato interessante neste aspecto é a capacidade que determinados açúcares livres têm de evitar a interação entre as lectinas e os receptores localizados na superfície celular. Esta propriedade é tão fundamental que as lectinas podem ser classificadas em grupos de acordo com o carboidrato inibidor. Esta ligação envolve forças de Van der Waals, causada por combinações de hidrogênios da proteína com grupos hidroxilas do açúcar, geralmente incluindo acoplamento de uma face hidrofóbica do açúcar com o lado de aminoácido aromático das cadeias peptídicas (WEIS e DRICKAMER, 1996).

1.4 Leguminosas como fonte de lectinas

Entre as lectinas mais estudadas estão as originárias de plantas, principalmente as da família Leguminosae, representando um grupo de proteínas similares estruturalmente, porém com diferentes especificidades a carboidratos. A subtribo Diocleinae (família Leguminosae) compreende 13 principais gêneros dentre os quais destacam-se os da *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea* (CAVADA et al., 2001).

A concanavalina A (ConA), lectina extraída das sementes da *Canavalia ensiformis* (família Leguminosae, tribo Phaseoleae, subtribo Diocleinae) foi a primeira lectina a ser isolada, sequenciada e a ter sua estrutura tridimensional determinada por cristalografia de raio-X. Os estudos bioquímicos, biofísicos e estruturais realizados com ConA tornam esta proteína a lectina melhor caracterizada até o momento (CAVADA et al., 2001).

A partir do isolamento da ConA, outras lectinas com propriedades físicas similares foram purificadas e parcialmente caracterizadas a partir de outras espécies da subtribo Diocleinae incluindo as lectinas da: *Canavalia brasiliensis*, ConBr (MOREIRA e CAVADA, 1984), *Cratylia floribunda*, CFL (OLIVEIRA et al., 1991), *Dioclea guianensis*, DGuiL (VASCONCELOS et al., 1991), *Canavalia bonariensis*, CABO (CAVADA et al., 1995) e *Dioclea violacea*, DVioL (MOREIRA et al., 1996) entre outras. Pesquisas demonstram que apesar de terem alta homologia com a ConA, as lectinas provenientes

desta subtribo apresentam importantes variações em seus efeitos biológicos (CAVADA et al., 2001).

1.5 A lectina da *Canavalia brasiliensis* (ConBr)

A *Canavalia brasiliensis* Mart. ex Benth. é uma trepadeira pertencente a família Fabaceae, cujos indivíduos podem atingir de 0,5m a 5m, dependendo do porte (arbustivo ou arbóreo) da espécie suporte. As raízes são amarelas; as folhas alternadas, trifolioladas; as flores apresentam coloração roxa e as pétalas bastante perfumadas que estão reunidas em inflorescências do tipo paniculada terminal, com escapo floral de coloração verde-arroxeadada. É conhecida popularmente na região de estudo como feijão-de-porco, feijão bravo ou feijão bravo do Ceará (GUEDES et al., 2009). Ela é uma espécie do novo mundo, com distribuição geográfica natural ampla estando presente no México, Caribe, Paraguai, Argentina e Nordeste e Sul do Brasil (SAUER, 1964).



Figura 3. Visão geral da *Canavalia brasiliensis*

Em relação às condições de cultivo, a *Canavalia brasiliensis* é relativamente tolerante à seca. Por exemplo, no cerrado brasileiro pode ser cultivada com sucesso,

como adubo verde durante a estação seca, sobrevivendo ao período de estiagem (maio-setembro), e sendo muito produtiva em condições climáticas mais favoráveis (BURLE et al., 1999). Além disso, ela cresce rapidamente no início das chuvas e, como resultado pode suprimir as ervas daninhas (CARVALHO et al., 2000).

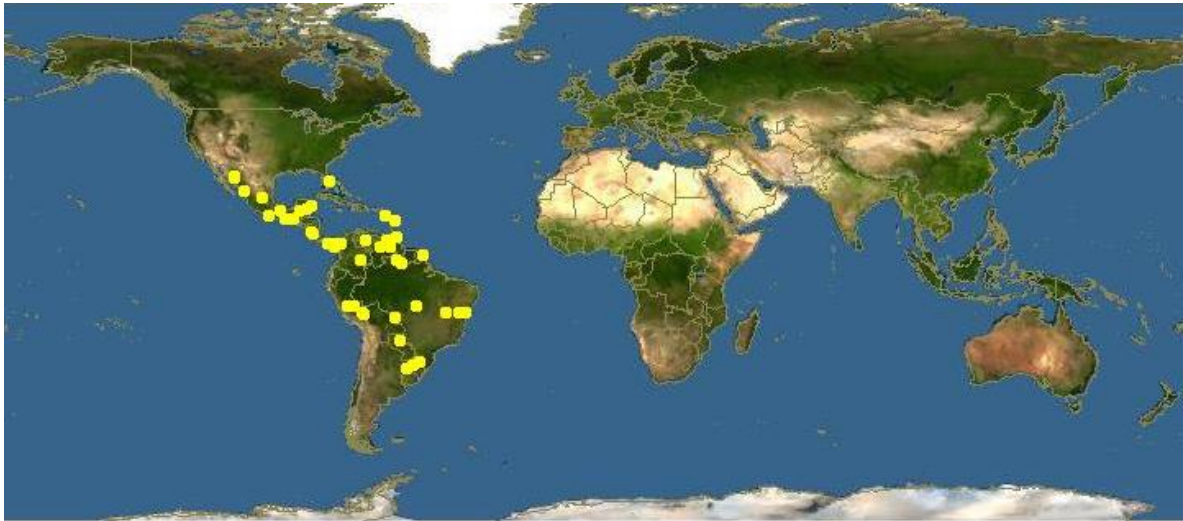


Figura 4. Distribuição geográfica da *Canavalia brasiliensis*

A ConBr é a lectina extraída e isolada das sementes da *Canavalia brasiliensis*, planta que pertence à família Leguminosae, tribo Phaseolae, subtribo Diocleinae. É uma lectina com especificidade para D-glicose/D-manose (MOREIRA e CAVADA, 1984). Entre os efeitos biológicos descritos para essa lectina destacam-se: a capacidade de estimular a proliferação de linfócitos e produção de interferon γ (BARRAL-NETTO et al., 1992), indução da liberação de histamina em ratos (GOMES et al., 1994) e de óxido nítrico (ANDRADE et al., 1999), estimulação da produção de macrófagos em camundongos C3H/HeJ (RODRIGUEZ et al., 1992), ativação *in vivo* de linfócitos T e indução da apoptose celular (BARBOSA et al., 2001), redução da glicemia sanguínea (MESQUITA et al., 2005), atividade cicatrizante (SILVA et al., 2009), inseticida (FREITAS et al., 2011), antibacteriana (CAVALCANTE et al., 2011) e efeito neuroprotetor (RUSSI et al., 2012).



Figura 5. Sementes da *Canavalia brasiliensis*

1.6 Respostas celulares desencadeadas pelas lectinas vegetais

Em processos normais ou patológicos, as células devem ser capazes de interagir com o meio ambiente através de sinais, recebendo estes do meio extracelular e repassando-os para o interior da célula. Para a transdução desses sinais, além das interações entre proteína extracelular e receptor protéico de superfície celular, outras interações importantes são as do tipo carboidrato-proteína.

Sabendo-se que todas as células têm um revestimento de carboidrato complexados a proteínas (glicoproteínas) e a lipídios (glicolipídios) e que as lectinas se caracterizam pela interação com carboidratos, podemos perceber a importância e o potencial biológico dessas moléculas nos processos fisiológicos e patológicos através de sua capacidade de mediar e codificar interações celulares (BREWER et al., 2002).

1.6.1 Efeito das lectinas vegetais sobre linfócitos

Lectinas isoladas de diversas fontes vegetais têm demonstrado ser ferramentas importantes na investigação biomédica, sendo utilizadas para a tipificação de grupos sanguíneos. A atividade mitogênica de algumas tem sido fundamental para a análise de eventos bioquímicos que ocorrem durante a estimulação de linfócitos *in vivo* (CRUZ et al., 2005).

O efeito de lectinas vegetais sobre células do sistema imune foi descrito pela primeira vez em 1960 por Peter Nowell, na Universidade da Pensilvânia, Filadélfia, que

observou a atividade mitogênica das lectinas de *Phaseolus vulgaris*, conhecida como fitohemaglutinina (PHA) ao cultivar leucócitos humanos na presença da lectina. Em 1970 foram descobertas mais três lectinas que também possuíam esse mesmo efeito sobre linfócitos: ConA, Pokeweed (obtida de *Phytolacca americana*) e Wisteria (obtida de *Wisteria floribunda*) (SHARON e LIS, 1989).

Esta ação mitogênica passou, então, a ser amplamente explorada em estudos morfológicos e funcionais, particularmente dos linfócitos, assim como para o diagnóstico de imunodeficiências e monitoração dos efeitos de imunossupressores e imunoterápicos (SHARON, 1983). Presume-se que, em linfócitos T, estas lectinas ligam-se ao complexo receptor de célula T (TcR) e promovem um sinal co-estimulante positivo, levando à síntese de IL-2 e seus receptores (KILPATRICK, 1999).

A ConA tem sido utilizada em pesquisas imunológicas e lectinas isoladas de outras espécies vegetais têm sido caracterizadas como potentes estimuladores de respostas imunes. Estudos utilizando a ConA demonstraram que essa atividade poderia ser inibida por baixas concentrações de monossacarídeos, concluindo desta forma que a estimulação mitogênica está intimamente relacionada com o sítio de ligação a carboidrato da lectina (SHARON, 1989). Porém Gosh et al (2009) relataram que a lectina extraída de *Abrus precatorius* mesmo quando inativada pelo calor é capaz de estimular linfócitos T e B, sugerindo que a interação lectina-célula pode ser através de outras regiões da molécula.

Barbosa et al. (2001) verificaram que a lectina ConBr é capaz de ativar linfócitos T em camundongos. Maciel et al. (2004) demonstraram o efeito mitogênico da lectina obtida das sementes de *Cratylia mollis* sobre linfócitos humanos.

1.6.2 Lectinas como moduladores dos macrófagos

Os macrófagos são essenciais para a defesa do hospedeiro por serem mediadores dos processos inflamatórios, através da produção de citocinas e quimiocinas que promovem o recrutamento e as ações de outras células do sistema imunológico. Após a ativação, os macrófagos expressam uma ou mais moléculas

citotóxicas como peroxidase, proteases citolíticas, óxido nítrico (NO) e citocinas pró-inflamatórias (SIVEEN e KUTTAN, 2009).

Na superfície celular dos macrófagos existem receptores com resíduos de D-manopiranosídeos aos quais as lectinas podem se ligar, modulando assim a função dessas células de defesa, através do aumento ou diminuição das suas funções celulares. Tomioka e Saito (1980) verificaram que macrófagos cultivados com as lectinas ConA e PHA não aumentaram a produção de peróxido de hidrogênio, enquanto a lectina do gérmen de trigo (WGA) promoveu significativa produção desse metabólito.

Keshewani e Sodhi (2006) investigaram o efeito das lectinas ConA, PHA e WGA na ativação de macrófagos peritoneais de camundongos e produção de óxido nítrico, observando que as lectinas ConA e WGA estimularam significativamente a produção de óxido nítrico de maneira dose dependente. Por outro lado, a lectina WGA não induziu a síntese de óxido nítrico nos macrófagos.

1.6.3 Migração de leucócitos induzida por lectinas de plantas

Os neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) possuem um tempo de vida curto na circulação sanguínea porque eles constitutivamente sofrem apoptose celular. Sobre certas condições, PMNs possuem uma função importante como efetores da resposta imune através da remoção de complexos imunes, fagocitose de partículas opsonizadas e liberação de mediadores inflamatórios. Os PMNs também estão envolvidos no processo de inflamação crônica e no desencadamento da resposta imune (ABDEL-SALAM, 2004).

Com relação aos efeitos *in vivo* de lectinas sobre neutrófilos, observa-se que elas possuem efeitos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, dependendo da via de administração utilizada, quando são injetadas nos animais.

Alencar et al. (2005) demonstraram que a AMA, lectina extraída das sementes de *Arum maculatum* quando administrada intraperitonealmente em ratos, promove a migração de neutrófilos de maneira dose dependente.

Coelho et al. (2006) verificaram que a lectina das sementes de *Annona coriacea* promove o influxo de neutrófilos para a cavidade peritoneal após 16 horas da injeção da

lectina de maneira dose dependente, resposta que foi acompanhada pelo aumento no número de células mononucleares.

Figueiredo et al. (2009) observaram que a lectina isolada das sementes de *Dioclea rostrata*, quando injetada por via intraperitoneal, promove a migração de neutrófilos para a cavidade abdominal de maneira dose dependente, observando que o maior influxo de células inflamatórias ocorreu após 24 h da aplicação do estímulo.

Efeito diferente foi observado em pesquisas que injetaram a lectina por via endovenosa, nas quais se observaram que as lectinas apresentam atividade anti-inflamatória, o que foi demonstrado em diferentes modelos experimentais: Alencar et al. (1999) demonstraram que a lectina de *Lonchocarpus sericeus* (LserL), ligadora de N-acetil-glicosamina, quando injetada por via endovenosa, inibe a migração de células inflamatórias para a cavidade peritoneal, o edema de pata induzido pela carragenina.

Alencar et al. (2005) verificaram que a LserL quando injetada por via endovenosa diminui a migração de células inflamatórias para a cavidade peritoneal em um modelo de peritonite em ratos Wistar.

Santi-Gadelha et al. (2006) verificaram a atividade anti-inflamatória da lectina extraída das sementes de *Araucaria angustifolia*, quando injetada por via endovenosa em ratos utilizando modelos de peritonite e edema de pata.

1.6.4 A interação entre células e lectinas promove a liberação de citocinas

As citocinas são polipeptídeos ou glicoproteínas extracelulares, hidrossolúveis produzidas por diversos tipos de células no local da lesão e por células do sistema imunológico através da ativação de proteinoquinases ativadas por mitógenos (OLIVEIRA et al., 2011).

Elas constituem um grupo de proteínas regulatórias, incluindo interleucinas (ILs), interferons (IFNs), fatores estimulantes de colônias (CSFs) e fatores de crescimento (GFs). Seus efeitos biológicos incluem a estimulação ou inibição da proliferação celular, citotoxicidade/apoptose, atividade antiviral, diferenciação e aumento da expressão de receptores de membrana celular. As citocinas (tabela 2), especialmente as

responsáveis pela defesa do hospedeiro, têm sido utilizadas como agentes bioterapêuticos (MEAGER, 2006).

De acordo com Bilate (2007), as principais características das citocinas são:

1. Uma mesma citocina pode ser produzida por mais de um tipo celular;
2. Uma mesma citocina pode ter diferentes efeitos, dependendo das condições do microambiente – pleiotropismo;
3. Diferentes citocinas podem exercer a mesma função – redundância;
4. As citocinas podem potencializar ou inibir o efeito de outras citocinas – sinergismo ou antagonismo, respectivamente;
5. A maioria das citocinas exerce efeitos parácrinos (ação sobre células presentes nas proximidades das células produtoras da citocina) ou efeitos autócrinos (ação sobre o tipo celular que a produz). Além disso, algumas citocinas exercem efeitos endócrinos, agindo sobre células presentes em outros locais que não os da célula produtora daquela citocina.

Pesquisas têm demonstrado que a resposta celular induzida pelas lectinas é acompanhada pela síntese e secreção de citocinas. De acordo com Tripathi e Maiti (2005), a lectina extraída das sementes de *Abrus precatorius in vitro* sobre esplenócitos induz a produção de citocinas como interleucina-2 (IL-2), interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral (TNF- γ).

Liu e Park (2007) verificaram que a lectina de *Viscum album* induz a expressão de IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IFN- γ em células mononucleares de sangue periférico e linfócitos T humanos.

Cheung et al. (2009) verificaram que a lectina extraída da banana Del Monte (*Musa acuminata*) promove a proliferação de esplenócitos murinos levando a produção de IFN- γ , IL-2 e TNF- α .

Tabela 2. Principais citocinas, suas funções e implicações terapêuticas

Citocina	Células produtoras	Alvos e efeitos	Implicação terapêutica
1. Citocinas relacionadas à resposta imune inata			
TNF- α	Macrófagos, células dendríticas e células endoteliais	Vasculatura (inflamação); fígado (indução de proteínas da fase aguda), caquexia, morte celular e ativação de neutrófilos	doenças auto-imunes
IL-1	Monócitos, macrófagos, células endoteliais e epiteliais	Vasculatura (inflamação), hipotálamo (febre), fígado (indução de proteínas da fase aguda)	choque séptico (modelos experimentais); artite reumatoide (ensaio clínico)
IL-12	Macrófagos, células dendríticas	Ativa células NK, promove a diferenciação de células Th1	IL-12 - Linfomas; anti-IL-12, doença de Crohn (ensaios clínicos)
IL-6	Macrófagos, células endoteliais e fibroblastos	Fígado (induz proteínas da fase aguda), promove proliferação de células B e secreção de anticorpos, inibe a diferenciação de células T reguladoras	IL-6, câncer (ensaio clínico)
IFN- α	Macrófagos	Induz a resposta antiviral, aumenta a expressão de MHC classe I e ativa células NK	IFN recombinante, hepatite e câncer (uso)
IL-23	Macrófagos	Promove a diferenciação de células Th 17	Anti-IL-23, encefalomielite auto-imune (modelo experimental)
2. Citocinas relacionadas à resposta imune adaptativa			
IL-2	Células T	Induz proliferação de células T e B, ativação de células NK e pode promover morte induzida por ativação	Anti-receptor de IL-2, rejeição de transplantes (modelos experimentais)
IFN- γ	Células Th1, células T CD8+, células NK	Ativa macrófagos, induz a expressão de MHC classe I e classe II, aumenta apresentação de antígenos	Doença granulomatosa crônica, osteopetrose (em uso)
IL-5*	Células Th2	Promove diferenciação e ativação de eosinófilos	Anti-IL-5, síndrome hipereosinofílica (ensaio clínico)
IL-4	Células Th2, mastócitos	Promove a diferenciação de células Th2 e mudança de classe de anticorpos para IgE	IL-4, leucemia (ensaio clínico)
IL-17	Células Th17, neutrófilos	Promove inflamação induzindo a produção de citocinas inflamatórias como IL-6, IL-1 e TNF- α em células endoteliais	Anti-IL-17, doenças auto-imune (modelos experimentais)
IL-10	Macrófagos, células dendríticas, linfócitos T reguladores	Inibe proliferação de células Th1	IL-10, psoríase e hepatite C
TGF- β	Células T, macrófagos, fibroblastos	Inibe proliferação de células T e B, inibe ativação de macrófagos, promove mudança de classe de anticorpos para IgE diferenciação de células T reguladoras	TGF- β , câncer (ensaio clínico); anti-TGF- β , leishmaniose e (modelo experimental)
3. Citocinas relacionadas à hematopoiese			
Eritropoetina	Hepatócitos	Produção de eritrócitos	Epogen, estimula produção de eritrócitos (em uso)
IL-11,	Macrófagos, células endoteliais, fibroblastos	Produção de plaquetas	Neumega, estimula a produção de plaquetas (em uso)
GM-CSF,	Células Th1 e Th2, macrófagos e mastócitos	Produção de granulócitos e macrófagos, maturação e ativação de células dendríticas células	Leukine, estimula a produção mielóides após transplante de medula óssea (em uso)
G-CSF,	Macrófagos, células endoteliais, fibroblastos	Produção de neutrófilos	Neupogen reduz o risco de infecção em pacientes com câncer submetidos à quimioterapia (em uso)

TNF, fator de necrose tumoral; IL, interleucina; IFN, interferon; TGF, fator de crescimento transformante; GM-CSF, fator estimulante da colônia de granulócitos e macrófagos; G-CSF, fator estimulante da colônia de granulócitos (Bilate, 2007).

1.6.5 Lectinas promovem apoptose celular por meio diferentes mecanismos

A apoptose é um processo controlado geneticamente que atua na remoção de células indesejáveis cujo processo está envolvido tanto em funções fisiológicas quanto patológicas, sendo vital para o desenvolvimento normal, para a manutenção da homeostasia celular, bem como para manutenção de um sistema imune efetivo. (BÖHM e SCHILD, 2003). Ela se caracteriza por ocorrer em células individualizadas geralmente rodeadas por células saudáveis apresentando condensação do citoplasma e núcleo, manutenção da integridade de organelas, convolução da membrana celular seguida pela sua fragmentação e formação de “corpos apoptóticos”, sem liberação do conteúdo do citoplasma no meio extracelular (HORVITZ, 2003).

Esta via de morte celular envolve proteases, chamadas caspases, as quais clivam diferentes substratos celulares. Dois principais caminhos de ativação das caspases foram descritos e reconhecidos: um envolve a ativação dos “receptores da morte”, que estão localizados na superfície da célula (via extrínseca), e o outro é provocado por várias formas de estresse, incluindo suporte de citocinas inadequado e diversos tipos de danos no DNA (via intrínseca). Ambos os caminhos da apoptose têm grupos de proteínas independentes de caspases iniciadoras, e o caminho converge para a utilização do mesmo grupo de caspases efetoras que executam o final do programa de morte celular (ADAMS, 2003).

A atividade anti-proliferativa de lectinas tem sido demonstrada *in vitro* e *in vivo*, sugerido que estas proteínas possuem potencial biotecnológico como agentes terapêuticos. As lectinas são capazes de se ligar a receptores localizados na superfície de células cancerígenas promovendo citotoxicidade. Inibição do crescimento tumoral e apoptose celular (de MEJIA & PRISECARU, 2005).

Foi demonstrado por Huyen et al. (2002) que extratos das lectinas de *Viscum album* induzem a apoptose de células endoteliais *in vitro*, o que poderia explicar o efeito que estas lectinas apresentam na regressão de tumores.

Peng et al. (2009) observaram que a lectina extraída da *Clematis montana* exibiu atividade antitumoral por meio da indução da apoptose em células L929.

Liu et al. (2009) verificaram que a lectina extraída *Polygonatum odoratum* induz apoptose em células L929 de fibrosarcoma murinos alterando o potencial mitocondrial transmembrana e liberação do citocromo c levando a ativação das caspases 3, 8 e 9.

2. REFERÊNCIAS

ABDEL-SALAM, B. K. A. T-cell proliferation by surface molecules expression on polymorphonuclear neutrophils stimulated with IL-4 in superantigen presence. **Allergologia Immunopathologia** (Madr), v. 40, n. 2, p. 81-87, 2012.

ADAMS, J. M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. **Genes Development**, v.17, N. 20, p. 2481-2495, oct. 2003.

ALENCAR, V. B. M.; ASSREUY, A. M. S.; ALENCAR, N. M. N.; MEIRELES, A. V. P.; MOTA, M. R. L.; ARAGÃO, K. S.; CAJAZEIRAS, J. B.; NAGANO, C. S.; BRITO, G. A. C.; SILVA, L. I. M. M.; PINTO, V. P. T.; SAMPAIO, A. H.; DEBRAY, H.; CAVADA, B. S.; RIBEIRO, R. A. Lectin of *Pisum arvense* seeds induces *in vivo* and *in vitro* neutrophil migration. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.7, n. 3, p. 375–381, March, 2005.

ALENCAR, N.M.N.; TEIXEIRA, E.H.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S.; FLORES, C.A.; RIBEIRO, R.A. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediators of Inflammation**, v. 8, n. 2, p. 107-113, 1999.

ALENCAR, N.M.N.; CAVALCANTE, C.F.; VASCONCELOS, M.P.; LEITE, K.B.; ARAGÃO, K.S.; ASSREUY, A.M.S.; NOGUEIRA, N.A.P.; CAVADA, B.S.; VALE, M.R. Anti-inflammatory and anti-microbial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental model of infectious peritonitis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, n. 7, p. 919-922, 2005.

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

BARRAL-NETTO, M.; SANTOS, S. B.; BARRAL, A.; MOREIRA, L. I. M.; SANTOS, C. F.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T.; CAVADA, B. S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleae tribe. **Immunological Investigations**, v. 21, n.4, p. 297-303, jul. 1992.

BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B.; GRANGEIRO, T. B.; FREITAS, L. A. R.; BARRAL-NETTO, M. *In vivo* lymphocyte activation and apoptosis by lectins of Diocleinae subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p.673-678, jul. 2001.

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

BÖHM, I; SCHILD, H. Apoptosis: the complex scenario for a silent cell death. **Molecular Imaging & Biology**, v. 5, n. 1, p. 2-14. Jan.-Feb. 2003.

BREWER, C.F.; MICELI, M.C.; BAUM, L.G. Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 12, n. 5, p. 616-23, 2002.

BURLE, M. L.; LATHWELL, D. J.; SUHET, A. R.; BOULDIN, D. R.; BOWEN, W. T.; RESCK, D. V. S. Legume survival during the dry season and its effect on the succeeding maize yield in acid savannah tropical soils. **Tropical Agriculture**, v. 76, p. 217-221, 1999.

BUTERA, A. P.; SOUZA FILHO, J. D.; CARVALHO, D. T.; FIGUEIREDO, R. C.; FARIA, L. C. A.; NUNES, M. A.; PRADO, M. A. F.; ALVES, J. R. ANDRADE, M. H. G.; SILVA, K. T. S. Síntese de amidas e sulfonamidas de β -d-galactopiranosilamina e β -lactosilamina e avaliação de suas interações com lectinas de *Erythrina cristagalli* e de *Ricinus communis*. **Química Nova**, v. 30, n. 5, 1267-1274, jul. 2007.

CARVALHO, A. M.; SODRE FILHO, J. Uso de adubos verdes como cobertura do solo. Boletim de Pesquisa - Embrapa Cerrados n. 11. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Cerrados, Planaltina, Brazil. 2000.

CAVADA, B. S. Isolation and characterization of a lectin from *Canavalia bonariensis* seeds. In: Interlec 16, 1995, Toulouse. **Anais do Interlec** 16, 1995.

CAVADA, B.S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T.B.; BARRAL-NETTO, M. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity Lesson and biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins, **Current Opinion and Peptide Science**, v. 2, n. 2, p.123-135, jun. 2001.

CAVADA, B. S.; MORENO, F. B.; DA ROCHA, B. A.; DE AZEVEDO, W. F. JR.; CASTELLÓN, R. E.; GOERSCH, G. V.; NAGANO, C. S.; DE SOUZA, E. P.; NASCIMENTO, K. S.; RADIS-BAPTISTA, G.; DELATORRE, P.; LEROY, Y.; TOYAMA, M. H.; PINTO, V. P.; SAMPAIO, A. H.; BARETTINO, D.; DEBRAY, H.; CALVETE, J. J.; SANZ, L. cDNA cloning and 1.75 Å crystal structure determination of PPL2, an endochitinase and N-acetylglucosamine-binding hemagglutinin from *Parkia platycephala* seeds. **FEBS Journal**. v. 273 n. 17, p.3962-3974. Sep. 2006.

CAVALCANTE, T. T. A.; da ROCHA, B. A. M.; CARNEIRO, V. A.; ARRUDA, F. V. S.; do NASCIMENTO, A. S. F.; SÁ, N. C.; do NASCIMENTO, K. S.; CAVADA B. S.; TEIXEIRA, E. H.; Effect of lectins from Diocleinae subtribe against oral Streptococci. **Molecules**, v. 16, n. 5, p. 3530-3543, abril 2011.

CHEUNG, A. H.; WONG, J. H.; NG, T. B. *Musa acuminata* (Del Monte banana) lectin is a fructose-binding lectin with cytokine-inducing activity. **Phytomedicine**. v. 16, n. 6-7, p. 594-600, Jun. 2009.

COELHO, M. B., De SOUZA I. A.; FREIRE, M. G. M.; MARANGONI, S.; ANTUNES, E.; MACEDO, M. L. R. Neutrophil migration in mice induced by a mannose-binding lectin isolated from *Annona coriacea* seeds. v. 48, n. 5, Oct. p. 529 – 535, 2006.

DANGUY, A.; CAMBY, I.; KISS, R. Galectins and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, n. (2-3), p. 285-93, sep. 2002.

DIAZ, P. H.; GONZALEZ, O. M.; VELEZ, Y. R. P.; BAEZ, F. A. G. Aplicaciones de Las Lectinas. **Revista Cubana de Hematología Inmunología y Hemoterapia**, v. 15, n. 2, p. 91-95, maio-ago. 1999.

DUTTA, R. C. Peptide immunomodulators versus infection: an analysis. **Immunology Letters**, v. 83, n. 3, p. 1-9, sep. 2002.

FREITAS, C. D. T.; RAMOS, M. V.; SOUZA, D. P.; MARINHO-FILHO, J. D. B.; TEIXEIRA, F. M.; OLIVEIRA, J. S. Correlações entre atividade inseticida e resistência a proteólise de duas lectinas vegetais glicose/manose. **Comunicata Scientiae**, v. 2, n. 1, p. 34-41, agosto, 2011.

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**, v. 43, N. 10, p. 1442– 1449, oct. 2011.

FIGUEIREDO, J. G.; BITENCOURT, F. S.; MOTA, M. R.; SILVESTRE, P. P.; AGUIAR, C. N.; BENEVIDES, R. G.; NASCIMENTO, K. S.; DE MOURA, T. R.; DAL-SECCO, D.; ASSREUY, A. M.; CUNHA, F. Q.; VALE, M. R.; CAVADA, B. S.; ALENCAR, N. M. Pharmacological analysis of the neutrophil migration induced by *Dioclea rostrata* lectin: Involvement of cytokines and nitric oxide. **Toxicon**, v. 54, n. 6, p. 736-744, nov. 2009.

GABIUS, H.J.; ANDRÉ, S.; KALTNER, H.; SIEBERT, H. C. The sugar code: functional lectinomics. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1572, n. (2-3), p. 165-77, Sep. 2002.

GOMES, J. C.; ROSSI, R. R.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans, comparisom with concanavalina A. **Agents Actions**, v. 41, n. 3-4, p. 132-135, jul. 1994.

GUEDES, R.S; QUIRINO, Z. G. M.; GONÇALVES, E. P. Fenologia reprodutiva e biologia da polinização de *Canavalia brasiliensis* Mart. ex Benth (Fabaceae). **Biotemas**, v. 22, n. 1, p. 27-37, março, 2009.

GHOSH, D.; BHUTIA, S. K.; MALLICK, S. K.; BANERJEE, I.; MAITI, T. K. Stimulation of murine B and T lymphocytes by native and heat-denatured *Abrus* agglutinin **Immunobiology**, v. 214, n. 3, p. 227–234, oct. 2009.

GONZÁLEZ DE MEJÍA, E.; PRISECARU, V. I. Lectins as Bioactive Plant Proteins: A Potential in Cancer Treatment. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 6, p. 425-445, 2005.

HONG, M.; CASSELY, A.; MECHREF, Y.; NOVOTNY, M. V. Sugar-lectin interactions investigated through affinity capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B Biomedical Sciences and Applications**, v. 752, n. 2, p. 207-216, mar. 2001.

HORVITZ, H. R. Worms, Life, and Death. **Biosciences Reports**, v. 23, n. 5, p. 239-303, oct-dec. 2003.

HUYEN J. P. D. V.; BAYRY, J.; DELIGNAT, S.; GASTON, A. T.; MICHEL, O.; BRUNEVAL, P.; KAZATCHKINE, M. D.; NICOLETTI, A.; KAVERI, S. V. Induction of apoptosis of endothelial cells by *Viscum album*: a role for anti-tumoral properties of mistletoe lectins. **Molecular Medicine**, v. 8, n. 10, p. 600-606, Oct. 2002.

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

KILPATRICK, D. C. Mechanisms and assessment of lectin-mediated mitogenesis. **Molecular Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 55-65, feb. 1999.

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

LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 1, p. 45-55, 2010.

LIMA, H. C. Fatos e mitos sobre imunomoduladores. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 3, maio- jun. 2007.

LIU, B.; ZHANG, B.; MIN, M. W.; BIAN, H. J.; CHEN, L. F.; LIU, Q.; BAO, J. K. Induction of apoptosis by *Polygonatum odoratum* lectin and its molecular mechanisms in murine fibrosarcoma L929 cells. **Biochimica et Biophys Acta**, v. 1790, n. 8, p. 840-844, Aug. 2009.

LYU, S. Y.; PARK, W. B. Effects of Korean mistletoe lectin (*Viscum album coloratum*) on proliferation and cytokine expression in human peripheral blood mononuclear cells and T-lymphocytes. **Archives of Pharmacal Research**, v. 30, n. 10, p. 1252-1264. Oct. 2007.

LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1383, n. 1, p. 9-36, mar. 1998.

MACIEL, E.V.; ARAÚJO-FILHO, V. S.; NAKAZAWA, M.; GOMES, Y.M.; COELHO, L.C.; CORREIA, M.T. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals**, v. 32 n.1, p. 57-60, Mar. 2004.

MESQUITA, R. O.; ARAGÃO, K. S.; BITENCOURT, F.S.; SILVESTRE, P. P.; VASCONCELOS, M. P.; NASCIMENTO, K. S.; BENEVIDES, R. G.; VALE, M. R.; CAVADA, B. S.; ALENCAR, N. M. N. Lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) reduz a glicemia em ratos diabéticos. Anais da 57^a Reunião Anual da SBPC - Fortaleza, CE - Julho/2005.

MEAGER, A. Measurement of cytokines by bioassays: Theory and application. **Methods**, v. 38, n. 4, p. 237–252, apr. 2006.

MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S. Lectins from *Canavalia brasiliensis* Mart. Isolation, characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum**, v. 26, n. 2, p.113-120, 1984.

MOREIRA, R. A.; CORDEIRO, E. F.; GRANGEIRO, T. B.; MARTINS, J. L.; RAMOS, M. V.; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S. Isolation and partial characterization of a lectin from *Dioclea violacea* Benth seeds **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 8, p. 23-29, 1996.

NEUMANN, D.; LEHR, C. M.; LENHOF, H. P.; KOHLBACHER, O. Computational modeling of the sugar–lectin interaction. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 4, p. 437– 457, mar. 2004.

OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda*. **Revista Brasileira de Botânica**, v 14, p. 61-66, 1991.

OLIVEIRA, C. M. B.; SAKATA, R. K.; ISSY, A. M.; GEROLA, L. R.; SALOMÃO, R. Citocinas e Dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 255-265, mar./abr. 2011.

PENG, H.; LV, H.; WANG, Y.; LIU, Y. H.; Li, C. Y.; MENG, L.; CHEN, F.; BAO, J. K. *Clematis montana* lectin, a novel mannose-binding lectin from traditional Chinese medicine with antiviral and apoptosis-inducing activities. **Peptides**, v. 30, n. 10, p. 1805-1815, oct. 2009.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, n. 4, p. 132-138, apr. 1996.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHALAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae pv mori*. **Plant Science**, v. 160, n. 4, p. 739-744, mar. 2001.

RODRIGUEZ, D.; CAVADA, B. S.; ABREU-DE-OLIVEIRA, J. T.; De-AZEVEDO-MOREIRA, R.; RUSSO, M. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding

plant lectins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25, n. 8, p. 823-826, 1992.

RÜDIGER, H.; SIELBERT, H. C.; SOLIS, D.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; ROMERO, A.; VON DER LIETH, C. W.; DIAZ-MAURIÑO, T.; GABIUS, H. J. Medicinal chemistry based on sugar code: fundamentals of lectinology and experimental strategies with lectins as targets. **Current Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 389-416, apr. 2000.

RUSSI, M. A.; VANDRESEN-FILHO, S.; RIEGER, D. K.; COSTA, A. P.; LOPES, M. W.; CUNHA, R. M.; TEIXEIRA, E. H.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; TASCA, C. I.; LEAL, R. B. ConBr, a lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds, protects against quinolinic acid-induced seizures in mice. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 2, p. 288-297, Fevereiro, 2012

SANTI-GADELHA, T.; DE ALMEIDA GADELHA, C. A.; ARAGÃO, K. S.; DE OLIVEIRA, C. C.; LIMA MOTA, M. R.; GOMES, R. C.; DE FREITAS PIRES, A.; TOYAMA, M. H.; DE OLIVEIRA TOYAMA, D.; DE ALENCAR, N. M.; CRIDDLE, D. N.; ASSREUY, A. M.; CAVADA, B. S. Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, n. 4, p. 1050-1055, Dec. 2006.

SAUER, J. Revision of *Canavalia*. **Brittonia**, v. 16, n. 2, p. 106-181, 1964.

SELL, A. M.; COSTA, C. P. da. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 2, p. 297-303, 2000.

SHARON, N. Lectin receptors as lymphocyte surface markers. **Advances in Immunology**, v. 34, p. 213-98, 1983.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, v. 246, n. 4927, p. 227-234, oct. 1989.

SHARON, N.; LIS, H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. **The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates**, Advances in Experimental medicine and Biology, v. 491, p. 1-16, 2001.

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

SILVA, F. O.; ARAÚJO, R. V. S.; SCHIRATO, G. V.; TEIXEIRA, E. H.; de MELO JÚNIOR, M. R.; CAVADA, B. S.; LIMA-FILHO, J. L.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; PORTO, A. L. F. Perfil de proteases de lesões cutâneas experimentais em camundongos tratadas com a lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 6, p. 1808-1814, set, 2009.

SILVA, F. O.; SANTOS P. N.; MELO C. M. L.; TEIXEIRA, E. H.; CAVADA, B. S.; ARRUDA, F. V.; CAJAZEIRAS, J. B.; ALMEIDA, A. C.; PEREIRA, V. A.; PORTO A. L. F.

Immunostimulatory activity of ConBr: a focus on splenocyte proliferation and proliferative cytokine secretion. **Cell Tissue Res.** v. 346, n. 2, p. 237-244, nov. 2011.

SIVEEN, K. S.; KUTTAN, G. Role of macrophages in tumour progression. **Immunology Letters**, v. 123, n. 2, p. 97–102, apr. 2009.

SUMNER J. B.; HOWELL, S. F. Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. **Journal of Bacteriology**, v. 32, n. 2, p. 227-237, aug. 1936.

TOMIOKA, H.; SAITO, H. Effects of Some Plant Lectins on Hydrogen Peroxide Release from Macrophages Induced with Streptococcal Preparation OK-432. **Infection and Immunity**, v. 28, n. 2, p. 336-343, May, 1980.

TRIPATHI, S.; MAITI, T. K. Immunomodulatory role of native and heat denatured agglutinin from *Abrus precatorius*. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, n. 2, p. 451–462, feb. 2005.

VAN DAMME, E.J.M., Lannoo, N., Peumans, W.J., 2008. Plant lectins. **Advances in Botanical Research**, 48, 107–209.

VASCONCELOS, I. M.; CAVADA, B. S. ; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A. Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea guianensis*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 15, n. 2, p. 137-154, jun. 1991.

WEIS, W. I.; DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annual Review Biochemistry**, v.65, p.441-473, 1996.

3. CAPÍTULO 1: Immunostimulatory activity of ConBr: A focus on splenocyte proliferation and proliferative cytokine secretion

ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO CELL AND TISSUE RESEARCH

Fator de impacto: 2.8



Immunostimulatory activity of ConBr: A focus on splenocyte proliferation and proliferative cytokine secretion

Flávio de Oliveira Silva^a, Priscila das Neves Santos^b, Cristiane Moutinho Lagos de Melo^c, Edson Holanda Teixeira^d, Benildo de Souza Cavada^d, Francisco Vassiliepe Sousa Arruda^d, João Batista Cajazeiras^d, Alysson Chaves Almeida^d Valéria Alves Rêgo Pereira^c and Ana Lúcia Figueiredo Porto^a

^aDepartamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, Brazil, ^bCentro de Ciências biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brazil, ^cDepartamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ-UFPE, Pernambuco, Brazil, ^dDepartamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil.

Correspondence Address: Flávio Oliveira Silva, Setor de Biotecnologia, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE, Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária 50670-420, Recife, PE, Brazil. Fax: 55-81-2101-2640, Phone: 55-81-2101-2631. E-mail address: foliveirasilva@gmail.com

Abstract

Lectins constitute a class of glycoproteins, which are capable of selectively and reversibly binding to carbohydrates, distinguishing small structural differences in complex oligosaccharides. Studies have shown that the binding of lectins to cell-surface carbohydrates can lead to various effects such as cellular proliferation, histamine release, and cytokine production. *Canavalia brasiliensis* lectin (ConBr) is a (D-mannose) D-glucose lectin. In this study, murine splenocytes were cultured to determine the effect of ConBr on cell proliferation, nitric oxide (NO) release, and cytokine secretion. In addition, cellular viability assays were performed to evaluate any mitogenic activity induced by this lectin. ConBr significantly increased cell proliferation with minimal cell damage. This lectin was able to induce an increased production of cytokines such as IL-2, IL-6, and IFN- γ and a decreased production of IL-10. The release of NO was also observed. The results of this study indicate that ConBr could potentially be used as an immunomodulator.

Keywords: *Canavalia brasiliensis*, ConBr, lectins, glucose/mannose binding-lectin, proliferative activity

Introduction

Lectins are ubiquitous proteins of non-immune origin present in plants, microorganisms, animals, and humans; these proteins specifically bind to defined monosugar or oligosaccharide structures. Significant progress has been made in recent years in understanding the crucial roles played by lectins in several biological processes (Wu et al., 2009).

The most thoroughly investigated lectins are derived from plants, particularly from the Leguminosae family. Legume lectins are a large group of structurally similar proteins with distinct carbohydrate specificities. The subtribe Diocleinae (Leguminosae) comprises 13 genera, mostly from the New World, and lectins have been isolated from plants belonging to three of these genera, i.e. *Canavalia*, *Cratylia*, and *Dioclea* (Cavada et al., 2001).

Many studies have shown immunological activity induced by D-mannose (D-glucose) and other specific binding lectins. In fact, a large number of lectins with distinct characteristics and specificities have been used for their immunomodulatory activity, lymphoproliferation, and functional activation of monocytes and macrophage-like cells (Tamma et al., 2003; Lee et al., 2007; Melo et al., 2010a).

ConBr, a lectin isolated from *Canavalia brasiliensis* seeds, presents similar homology (99%) and physical properties to Concanavalin A (ConA), a lectin isolated from *Canavalia ensiformis*. ConA was the first lectin to be isolated and sequenced, and to have its three-dimensional structure determined by x-ray crystallography (Cavada et al., 2001).

ConBr has previously been shown to induce the following effects: proliferation and IFN- γ production in cultured peripheral blood mononuclear cells (Barral-Netto et al., 1992); nitric oxide (NO) production by murine macrophages *in vitro* and *in vivo* (Andrade et al., 1999); *in vivo* lymphocyte activation and apoptosis (Barbosa et al., 2001); IFN- γ , IL-10, IL-4, granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), and TNF- α production in human peripheral blood mononuclear cells (Cavada et al., 2001); and histamine release from mast cells (Lopes et al., 2005).

To investigate the development of immune response, the present study analysed, *in vitro*, the immunostimulatory response induced by ConBr in murine splenocyte cultures by measuring the levels of NO, IFN- γ , IL-6, IL-2, and IL-10 produced. Changes in cell proliferation and cell death induced by the ConBr lectin were also analysed.

Materials and methods

Animals

Male BALB/c mice, 6–8 weeks old, were housed in open-top cages and maintained on food and water *ad libitum*. A room temperature of $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and a light/dark cycle of 14/10 h were maintained.

Lectins

The lectin isolated from *Canavalia brasiliensis* seeds was purified by affinity chromatography on a Sephadex G-50 column (Cavada et al., 1996). *Canavalia ensiformis* lectin (Concanavalin A) was purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA).

Splenocytes

A single-cell suspension of spleen from normal mice under aseptic conditions was prepared by homogenization in RPMI-1640 medium. The suspension was centrifuged to obtain a cell pellet. The contaminating red blood cells were removed by using haemolytic Gey's solution. Cells were centrifuged and suspended in complete RPMI-1640. The cell concentration was adjusted to 1×10^6 cells/ml, and the viability of the splenocytes (tested by trypan blue dye exclusion) was always over 90%.

1. Proliferation of murine splenocytes

Mice splenocytes (4×10^5 cells/well) were cultured ($37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$) in triplicate on 96-well culture plates, and incubated with ConA (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and ConBr (2.5, 5, and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). A non-stimulated culture plate was used as a negative control. After an initial 60 h of incubation, a radioactive precursor, 0.5 μCi [^3H]-TdR (Amersham Biosciences), was added to each well. Cultures were incubated for an additional 12 h before they were harvested, and the incorporated radioactivity was determined (Wong and Ng, 2003).

Cytokine determination

Splenocytes were cultured on 24-well plates at a density of 10^6 cells/well. Cytokines were quantified at 24 h, 48 h, 72 h, and 6 days in the supernatants of cultures stimulated with ConBr at 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ConA at 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, or maintained only in the culture medium (negative control). Culture supernatants were collected, and the concentrations of the cytokines (IL-2, IL-6, IL-10, and IFN- γ) present in the supernatants were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay from Kit OptEIA (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), according to the manufacturer's instructions.

Determination of nitric oxide (NO) Production

Mice spleen cells were used to evaluate nitrite concentration after stimulation with ConA (2.5 µg/ml) and ConBr (10 µg/ml) for 24 h, 48 h, 72 h, and 6 days. Culture media were carefully collected for subsequent analysis using the colorimetric Griess method (Ding et al., 1988). NO concentration was estimated using a standard curve (3.12–100 µmol/ml).

Flow cytometry analysis

The levels of apoptosis 24 and 48 h after ConA (2.5 µg/ml) and ConBr (10 µg/ml) treatments were examined to monitor cell recovery. Annexin V binding and propidium iodide staining were determined using flow cytometry. The cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and double stained with FITC-coupled Annexin V protein and propidium iodide for 20 min. Flow cytometry was performed using a 488-nm laser coupled to a cell sorter (FacsCalibur; BD Biosciences, Mountain View, CA, USA). The results were analysed using dot plots. Double negatives (Annexin-FITC⁻/PI⁻) were considered viable cells. Annexin-FITC⁺/PI⁻ represented splenocytes in the early stages of apoptosis. Double positives (Annexin-FITC⁺/PI⁺) represented spleen cells in the late stages of apoptosis, and PI⁺ cells were considered to be necrotic.

Statistical analysis

All data were analysed using non-parametric tests. To detect differences among groups, the Mann–Whitney U test was used. All results were expressed using mean values ± standard deviation (SD) and were considered statistically significant when the p value was <0.05.

Results and Discussion

Proliferative response was induced by ConBr treatment through IL-2, IL-6, and cell-proliferation stimuli

Carbohydrates can act as the intermediates of biological communication in biological processes such as differentiation, proliferation, and certain cell-cell interactions that are crucially important in both physiological and pathological phenomena. The information contained in the enormous variety of oligosaccharide structures normally conjugated to proteins or lipids on cell surfaces (glycocodes) is recognized and deciphered by a specialized group of structurally diverse proteins, the lectins (Sanz-Aparicio et al., 1997).

Lectins find application in a variety of studies, including blood group and erythrocyte polyagglutination studies, lymphocyte subpopulation studies, histochemical studies of healthy and pathological conditions, and chromatographic experiments. Lectins are believed to be dynamic contributors to tumour cell recognition, cell adhesion and localization, signal transduction across membranes, mitogenic stimulation, potentiation of host immune defence, cytotoxicity, and apoptosis (Wang et al., 2000).

Several plant lectins, such as the L4 isolectin of PHA, ConA, the pokeweed mitogen (PWM), *Maclura pomifera* agglutinin (MPA), and *Pisum sativum* agglutinin (PSA), are potent mitogens for human lymphocytes. The growth stimulatory effect of lectins corresponds with the observation that certain growth factors/interleukins recognize their receptors via a lectin-like interaction. Furthermore, some plant lectins have the capacity to non-specifically augment the host's immune defence mechanisms (Mody et al., 1995).

A proliferative assay, using the [³H]-thymidine technique, was performed to measure ConBr stimulation in cell cultures. An increase in cell number indicates an effect on the immune system by the secretion of cytokines and the activation of accessory cells. Our results showed that ConBr was able to induce the proliferation of murine splenocytes at all concentrations; ConA was used as a positive control (Figure 1). At the same concentration (2.5 µg/ml), ConBr stimulated greater proliferation than did ConA. The maximum proliferation index was observed at 10µg/ml. The proliferation indices of both ConA and ConBr were higher than those of non-stimulated cells.

Mitogenic lectins utilize the capacity of protein-carbohydrate interactions and glycan cross-linking to stimulate immune parameters. The degree of immune response depends on the affinity of a lectin for the cell-surface glycans of receptors and co-receptors (Gabiús et al., 1994).

Activated proliferating lymphocytes are known to express a number of molecules on their surfaces, namely, CD25, CD69, CD71, and HLA-DR, usually expressed minimally or even absent from resting cells, and thus termed 'activation antigens' (Zangh et al., 2002). Of crucial importance for the delivery of IL-2 signals to regulatory T cells is the expression of CD25, which, along with CD122 and γ , confers high-affinity binding to IL-2 (Létourneau et al., 2009). ConBr was found to increase the *ex vivo* expression of CD25 on the surfaces of stimulated lymph node cells. CD25 comprises the chain of the IL-2 receptor, and its expression has also been demonstrated to be up-regulated in T lymphocytes upon stimulation with ConA (Barbosa et al., 2001).

The binding of multivalent lectins to cells results in the cross-linking of cell-surface receptors, which, in turn, is associated with a variety of biological signal transduction processes, including mitogenesis (Cavada et al., 2001). Many glucose, mannose, and

galactose-binding proteins have been demonstrated to stimulate cell proliferation. There is strong correlation between a high-binding capacity and the ability to activate naïve lymphocytes *in vitro*. ConA binds to T-cell receptor CD3 and to other cell-surface receptor molecules to induce a strong T-cell mitogenic response (Pani et al., 2000).

Glucose/mannose-specific lectins obtained from seeds of the same tribe (Dioclea) had similar structures, but were distinct in their ability to stimulate human lymphocytes. The diverse molecular forms of these lectins can be presented in a variety of combinations, which may explain the subtle differences in their mitogenic activities. These subtle differences may also be attributed to the amino acid sequence in the carbohydrate-binding site responsible for sugar interaction, which may affect the specificity for sugar in the cell membrane (Barral-Neto et al., 1992). Since ConBr is largely homologous to ConA, differing from it by only three residues (Grangeiro et al., 1997), it is believed that ConBr may produce similar effects through the recognition of cells by very distinct cell-surface receptors.

Many lectins act as mitogenic compounds. Abrin lectin, extracted from the *Abrus precatorius* plant, can induce the proliferation of splenocytes leading to a Th1 response, NK cell activation (Buthia et al., 2009), and the stimulation of peritoneal macrophages in mice splenocytes (Tripathi and Maiti, 2003). Jacalin, purified lectin from the seeds of the *Artocarpus heterophyllus* plant, stimulates T cells, especially T CD4+ lymphocytes (Pineau et al., 1990), promotes the binding of ConA to T-cell receptor CD3 and other cell surface co-receptor molecules, and induces a strong T-cell mitogenic response associated with cytokine expression and secretion (Pani et al., 2000; Tripathi and Maiti, 2005).

Protein carbohydrate interactions occur in a number of biochemical processes in a variety of different cell types including lymphocytes, mast cells, macrophages, and neutrophils (Barbosa et al., 2001; Lopes et al., 2005; Alencar et al., 2007; Figueiredo et al., 2009). These interactions are believed to serve as major signals in these cells, stimulating the release of proinflammatory mediators such as leukotrienes, NO, and cytokines, (Benjamin et al., 1997) including IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α , and GM-CSF (Cavada et al., 2001).

In the present study, we examined the immunostimulatory properties of ConBr on immune cells and attempted to determine the type of immune response by measuring the secreted cytokines produced by lectin-stimulated mice splenocytes.

Both of the lectins tested induced high IL-2 production (Figure 2). ConBr was capable of stimulating increased IL-2 at all experimental times as compared to control cultures and at 48 and 72 h as compared to ConA stimulation (Figure 2B and C). ConA also induced a release of IL-2 at all experimental times as compared to the control and at 24 h in relation to ConBr (Figure 2A). The IL-2 cytokine is known to be a T-cell growth factor, inducing the clonal expansion of T cells following antigen stimulation, and is also important for the differentiation of CD4⁺ T cells into Th1 and Th2 effector subsets (Hoyer et al., 2008).

High IL-6 production was also observed for both lectins at all experimental times (Figure 3), but no difference was observed between lectins, except at 48 hours, when ConA was shown to produce more IL-6 than ConBr (Figure 3B). IL-6 plays important roles in T-cell-mediated immune responses. It is a cofactor for T-cell proliferation and prevents cell death (Yang et al., 2005). In fact, both of the cytokines examined can act as proliferative agents with regard to both T and B lymphocytes.

ConBr induced higher IFN- γ and lower IL-10 production in cell cultures

ConBr cell cultures produced statistically significant increases ($p < 0.05$) in IFN- γ production as compared to control values at all experimental times (Figure 4). Similar behaviour was observed for both ConA and ConBr lectins, showing the similarity of these glucose/mannose lectins with respect to IFN- γ production. However, a distinct pattern was observed in IL-10 production (Figure 5). This cytokine was produced in lower quantities as compared to IFN- γ , but at 48 and 72 h, ConBr induced an increased production of IL-10 (Figure 5B and C). In contrast, ConA produced higher levels of IL-10 at 24 h and 6 days of culture (Figure 5A and D).

IL-10, which is produced by a variety of cells (including T lymphocytes, B lymphocytes, monocytes, and dendritic cells), has been identified as a cytokine with important anti-inflammatory and immunosuppressive properties. IL-10 is thought to play a major role in the limitation and termination of inflammatory responses. In addition, it regulates the growth and/or differentiation of various immune cells. When extensive IFN- γ secretion occurs, there is an associated rise in IL-10 production, which could be viewed as an important self-limiting (negative feedback) immune response mechanism (Couper et al., 2008).

Crane et al. (1984) used similar assays to those used in the present study to show that Jacalin-induced T lymphocytes secrete IFN- γ in culture supernatants. In addition, Melo et al. (2010a) showed that higher IFN- γ and lower IL-10 production could be induced by Cramoll 1,4 lectin.

ConBr stimulated higher nitric oxide (NO) release by splenocytes

Our assays showed an elevated release of NO in ConBr lectin-stimulated cultures (Figure 6). In fact, this lectin showed statistically significant increased NO values at all experimental times relative to both control and ConA cultures (Fig. 6).

NO is produced by macrophages and agents that induce iNOS expression, including various cytokines (IL-1 β , TNF- α , and IFN- γ), endotoxins (lipopolysaccharides and LPS), and a host of other agents (Vera et al., 1995). NO is a multi-faceted molecule with dichotomous regulatory roles in many areas of biology. The complexity of its biological effects is a consequence of its numerous potential interactions with other molecules, such as reactive oxygen species (ROS), metal ions, and proteins. The effects of NO are modulated by both direct and indirect interactions, which can be dose-dependent and cell-type specific (Kim et al., 2001).

Welsch and Schumacher (1983) showed that ConA could bind to macrophages *in vivo*, this being one of the mechanisms involved in NO production. In this study, we demonstrated that ConBr can induce cytokine production. Thus, ConBr can induce NO production by direct and indirect mechanisms. Rodriguez et al. (1992) demonstrated that ConBr has more pronounced effects on macrophage stimulation than ConA after peritoneal macrophage stimulation through the intraperitoneal injection of lectins. Andrade et al. (1999) found that ConBr induced an increase in NO release in mice resident peritoneal cells.

Other studies have confirmed that NO production can be induced by lectins such as the pokeweed mitogen lectin (Dong et al., 1996), banana lectin–BanLec (Wong and Ng, 2006), and Cramoll 1,4 (Melo et al., 2010a).

Low cell damage was induced by both ConBr and ConA lectins

A cell viability assay indicated that lectins induced minimal damage to cell survival, and about 90% of the cells obtained were viable (Figure 7). However, the results also demonstrated that at 24 h, ConBr and ConA induced a higher rate of apoptosis and late apoptosis relative to the control. After this same period, ConA induced increased necrosis with respect to ConBr and the control (Figure 7A). At 48 h, ConBr induced higher rates of apoptosis as compared to the control, late apoptosis as compared to the control and ConA, and necrosis as compared to ConA but not to the control. After the same period, ConA also induced increased necrosis with respect to the control (Figure 7B).

Cell death is generally considered to occur by 2 distinct pathways: apoptosis, in which cells deliberately activate a built-in death programme over several hours, and necrosis, which is an uncontrolled and rapid process of cell death (Murphy, 1999).

Many stimulatory mechanisms, induced by antigens or other compounds, can promote increased T-cell activation through reactive oxygen species and calcium accumulation (Melo et al., 2010b). However, calcium accumulation can lead to cell death through oxidative stress (Fesk, 2007). In fact, in studies where T-cell stimulation is analysed, cell death assays are very important for evaluating cell damage induced by the tested compounds. Our results demonstrated a minimal level of cell damage, which was similar between both ConBr and ConA lectins.

Experiments with other lectins have shown their immunostimulatory activities and consequent induction of cell death. Mistletoe lectin was shown to stimulate increased apoptosis in neutrophils (Lavastre et al., 2004), *Abrus agglutinin* stimulated apoptosis in thymocytes (Hegde, 1991), and ConA induced cell death in cultivated hepatocytes (Leist

and Wendel, 1996). The decreased cell viability observed following exposure to lectins may be due to oxidative damage caused by the NO induced by cytokines.

During the last 10 years, *Canavalia brasiliensis* lectin (ConBr) has been used in various biological models and has been shown to play an important role in T-cell signalization. Here, we demonstrated through various techniques, including flow cytometry, ELISA, and [³H]-thymidine incorporation, that this lectin has important immunomodulatory and immunostimulatory potential.

Acknowledgements

We are grateful to Lucas Ferreira da Rocha and Maria da Conceição Batista for their technical assistance. This work was supported by CAPES (Fundação de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, processo APQ-0493-2.11/08), and the Aggeu Magalhães Research Center of the Oswaldo Cruz Foundation in Recife, Brazil (CPqAM/FIOCRUZ).

References

- Alencar NMN, Assreuy AMS, Havt A, Benevides RG, Moura TR, Sousa RB, Ribeiro RA, Cunha FQ, Cavada BS (2007) *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotactic mediators. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 374:275–282
- Andrade JL, Arruda S, Barbosa T, Paim L, Ramos MV, Cavada BS, Barral-Netto M (1999) Lectin-Induced Nitric Oxide Production. *Cell Immunol* 194:98–102
- Barbosa T, Arruda S, Cavada BS, Grangeiro TB, Freitas LAR, Barral Netto M (2001) *In vivo* lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96:673–678

Barral-Netto M, Santos SB, Barral A, Moreira LI, Santos CF, Moreira RA, Oliveira JT, Cavada BS (1992) Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleae tribe. *Immunol Invest* 21:297–303

Benjamin CF, Figueiredo RC, Henriques MGMO, Barja-Fidalgo C (1997) Inflammatory and anti-inflammatory effects of soybean agglutinin. *Braz J Med Biol Res* 30:873–881

Bhutia SK, Mallick SK, Maiti TK (2009) *In vitro* immunostimulatory properties of *Abrus* lectins derived peptides in tumor bearing mice. *Phytom* 16:776–782.

Cavada BS, Barbosa T, Arruda S, Grangeiro TB, Barral-Netto M (2001) Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. *Curr Protein Pept Sci* 2(2):123–35

Couper KN, Blount DG, Riley EM (2008) IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 180:5771–5777

Crane I, Leung H, Barwick S, Parti S, Meager A (1984). The preparation of interferon gamma-producing T-cell hybridomas from jacalin-stimulated T lymphocytes and the SH9 T-cell line. *Immunol* 53:855–859

de Vera ME, Geller DA, Billiar TR (1995) Hepatic inducible nitric oxide synthase: Regulation and function. *Biochem. Soc. Trans.* 23:1008–1013

Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 141:2407–2412

Dong HD, Kimoto Y, Takai SI, Taguchi T (1996) Apoptosis as a Mechanism of Lectin-Dependent Monocyte-Mediated Cytotoxicity. *Immunol Invest* 25:65–78

Figueiredo JG, Bitencourt FS, Mota MRL, Silvestre PP, Aguiar CN, Benevides RG, Nascimento KS, Moura TR, Dal-Secco D, Assreuy AMS, Cunha FQ, Vale MR, Cavada BS, Alencar NMN (2009) Pharmacological analysis of the neutrophil migration induced by *D. rostrata* lectin: Involvement of cytokines and nitric oxide. *Toxicon* 54:736–744

Feske S (2007) Calcium signaling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol* 7:690–702

Gabius HJ (1994) Mini review. Non-carbohydrate binding partners/domains of animal lectins. *Int J Biochem* 26:469–477

- Grangeiro TB, Schriefer A, Calvete JJ, Raida M, Urbanke C, Barral-Netto M, Cavada B S (1997) Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. *Eur J Biochem* 248:43–48
- Hegde R, Maiti TK, Podder SK (1991) Purification and characterization of three toxins and two agglutinins from *Abrus precatorius* seeds by using lactamyl-sepharose affinity chromatography. *Anal Biochem* 194:101–109
- Hoyer KK, Doms H, Barron L, Abbas AK (2008) Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease. *Immunol Rev* 226:19–28
- Kim PKM, Zamora R, Petrosko P, Billiar TR (2001) The regulatory role of nitric oxide in apoptosis. *Int Immunopharmacol* 1:1421–1441
- Lavastre V, Cavalli H, Rathe C, Girard D (2004) Antiinflammatory effect of *Viscum album* agglutinin-I (VAA-I): induction of apoptosis in activated neutrophils and inhibition of lipopolysaccharide-induced neutrophilic inflammation *in vivo*. *Clin Exp Immunol* 137:272–278
- Lee JY, Kim JY, Lee YG, Byeon SE, Kim BH, Rhee MH, Lee A, Kwon M, Hong S, Cho JY (2007) *In vitro* Immunoregulatory effects of Korean Mistletoe lectin on functional activation of monocytic and macrophage-like cells. *Biol Pharm Bull* 30(11):2043–2051
- Leist M, Wendel A (1996) A novel mechanism of murine hepatocyte death inducible by Concanavalin A. *J Hepatol* 25:948–959
- Létourneau S, Krieg C, Pantaleo G, Boyman O (2009) IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol* 123(4):758–762
- Lopes FC, Cavada BS, Pinto VPT, Sampaio AH, Gomes JC (2005) Differential effect of plant lectins on mast cells of different origins on the histamine release induced by plant lectins. *Braz J Med Biol Res* 38:935–941
- Melo CML, Castro MCAB, Oliveira AP, Gomes FOS, Pereira VRA, Correia MTS, Coelho LCBB, Paiva PMG (2010a) Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. *Phytother Res* 24:000–000. DOI: 10.1002/ptr.3156
- Melo CML, Paim BA, Zecchin KG, Morari J, Chiarrati MR, Correia MTS, Coelho, LCBB, Paiva PMG (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
- Mody R, Joshi S, Chaney W (1995) Use of Lectins as Diagnostic and Therapeutic Tools for Cancer. *J Pharmacol Toxicol Methods* 33:(1)1–10
- Moreira RA, Cavada BS (1984) Lectin from *Canavalia brasiliensis* Mart. Isolation characterization and behaviour during maturation. *Biol Plantarum* 26:113–120

- Murphy MP (1999) Nitric oxide and cell death. *Biochim Biophys Acta* 1411:401–414
- Pani G, Colavitti R, Borrellor R, Galeotti T (2000) Endogenous oxygen radicals modulate protein tyrosine phosphorylation and JNK–1 activation in lectin-stimulated thymocytes. *Biochem J* 347:173–181
- Pineau N, Aucouturier P, Brugier JC, Preud'homme JL (1990) Jacalin: a lectin mitogenic for human CD4 T lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 80:420–425
- Rodriguez D, Cavada BS, Abreu de Oliveira JT, de Azevedo Moreira R, Russo M. (1992) Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. *Braz J Med Biol Res.* 25(8):823–826
- Sanz-Aparicio J, Hermoso J, Grangeiro TB, Calvete JJ, Cavada BS (1997) The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin. *FEBS Letters* 405:114–118
- Tamma SML, Kalyanaraman VS, Pahwa S, Dominguez P, Modesto RR (2003) The lectin jacalin induces phosphorylation of ERK and JNK in CD4⁺ T cells. *J Leukoc Biol* 73:682–688
- Tripathi S, Maiti TK (2003) Efficiency of heat denatured lectins from *Abrus precatorius* as immunoadjuvants. *Food Agric Immunol* 15:279–287
- Tripathi S, Maiti TK (2005) Immunomodulatory role of native and heat denatured agglutinin from *Abrus precatorius*. *Int J Biochem Cell Biol* 37:451–462
- Wanga H, Ng TB, Ooi VEC, Liu WK (2000) Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cell lines. *Int J Biochem Cell Biol* 32:365–372
- Welsch U, Schumacher U (1983) *In vivo* binding and effects of Concanavalin A (ConA) on rat and mouse pulmonary alveolar epithelial cells and macrophages. *Virchows Archiv* 44(1):45–56
- Wong JH, Ng TB (2003) Purification of a trypsin-stable lectin with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity. *Biochem Biophys Res Commun* 301(2):545–550
- Wong JH, Ng TB (2006) Isolation and characterization of a glucose/mannose-specific lectin with stimulatory effect on nitric oxide production by macrophages from the emperor banana. *Int J Biochem Cell Biol* 38(2):234–243

Wu AM, Lisowska E, Duk M, Yang Z (2009) Lectins as tools in glycoconjugate research. *Glycoconj J* 26:899–913

Yang Y, Ochando J, Yopp A, Bromberg JS, Ding Y (2005) IL-6 Plays a Unique Role in Initiating c-Maf Expression during Early Stage of CD4 T Cell Activation. *J Immunol* 174:2720–2729

Zhang J, Tang Q, Zimmerman-Kordmann M, Reutter W, Fan H (2002) Activation of B lymphocytes by GLIS, a bioactive proteoglycan from *ganoderma lucidum*. *Life Sci* 71:623–638

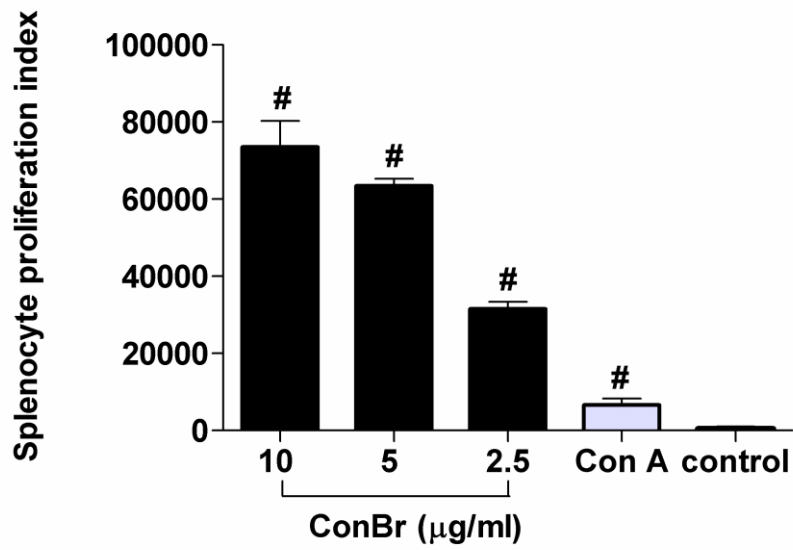


Fig. 1 Splenocytes proliferation. Murine splenocytes (10^6 cells/ml) were stimulated by ConBr (2.5–10 µg/ml) and ConA (2.5 µg/ml) for 72 h at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Non-stimulated splenocytes cultured under the same conditions were used as a control. Increases in cell number were measured using the [3H]-thymidine assay method. Values represent the mean ± SD of three replicates. Statistical analysis was done using the Prism 5.0 software. Differences were considered significant at $p < 0.05$ as compared to the control.

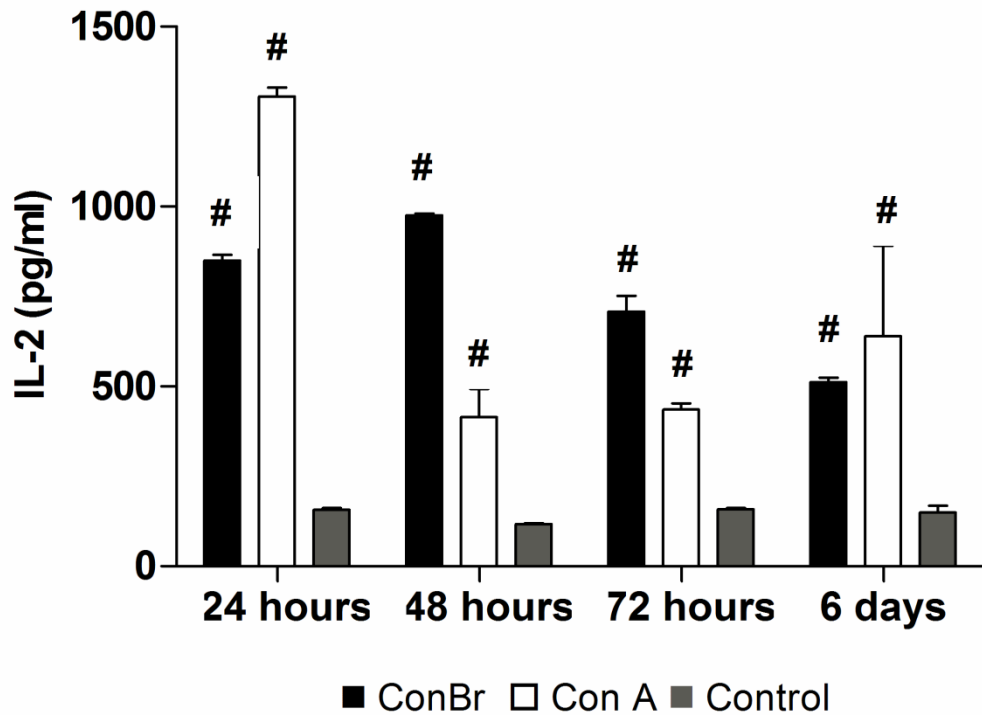


Fig. 2 IL-2 production in cell cultures. Cells cultured, *in vitro*, with ConBr and ConA lectins at 24 h, 48 h, 72 h, and 6 days, respectively. ConBr induced higher IL-2 production at all experimental times relative to control cultures, and at 48 and 72 h as compared to ConA stimulated cultures. Values represent the mean \pm SD of six independent experiments per group. Differences were considered significant at $p < 0.05$ as compared to control values.

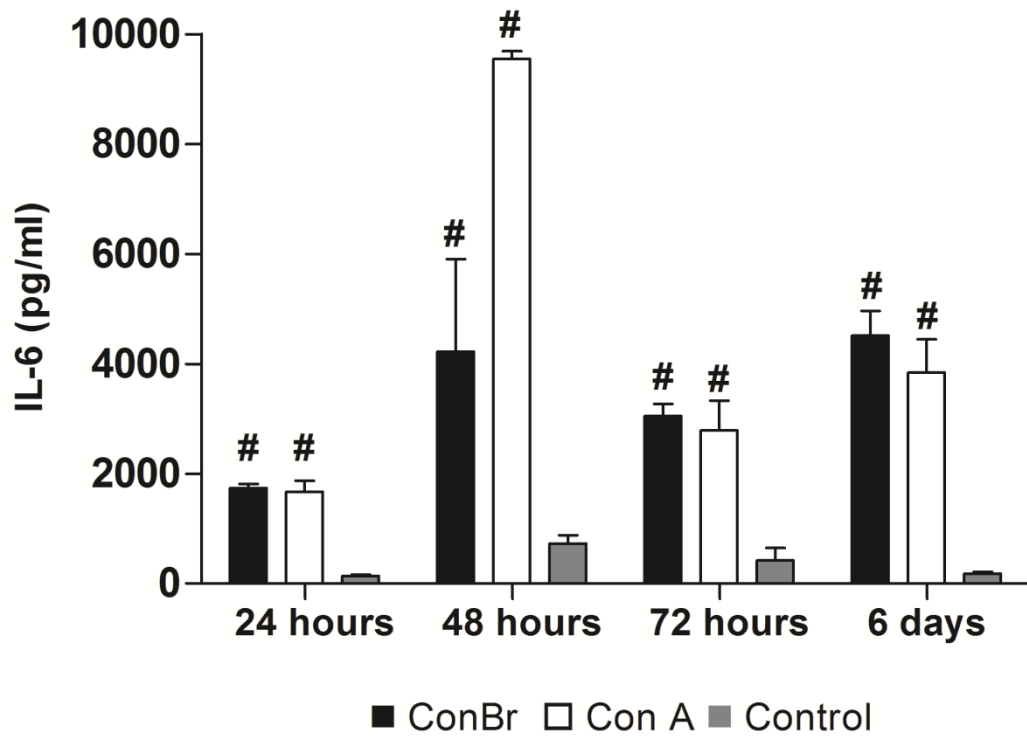


Fig. 3 IL-6 production in cells cultured with ConBr and ConA stimuli. Cells cultured, *in vitro*, with ConBr and ConA lectins at 24 h, 48 h, 72 h, and 6 days, respectively. Higher IL-6 production was observed for both lectins relative to the control at all experimental times. ConA produced higher IL-6 as compared to ConBr at 48 h. Values represent the mean \pm SD of six independent experiments per group. Differences were considered significant at $p < 0.05$ as compared to control values.

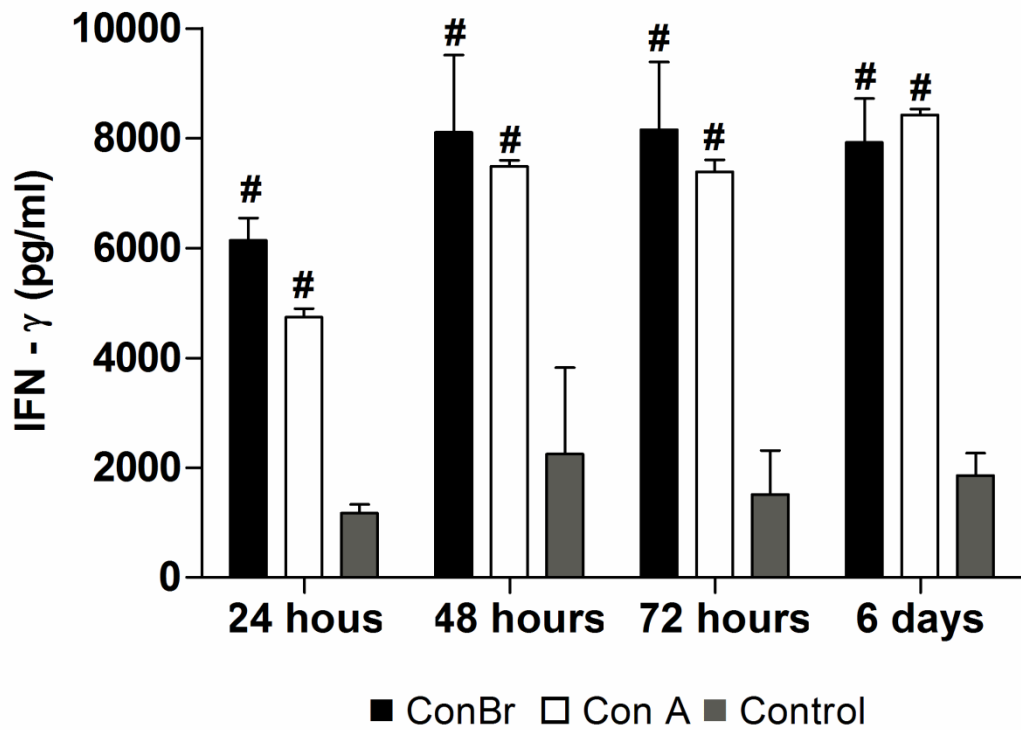


Fig. 4 IFN- γ production in splenocytes cultivated with ConBr and ConA stimuli. Cells cultured, *in vitro*, with ConBr and ConA lectins at 24 h, 48 h, 72 h, and 6 days, respectively. Non-stimulated splenocytes cultured under the same conditions were used as the controls. ConBr and ConA stimuli produced similar levels of IFN- γ in all experimental groups and produced significantly higher IFN- γ as compared to control cultures. Only at 24 h did ConBr produce higher levels of IFN- γ as compared to ConA. Values represent the mean \pm SD of six independent experiments per group. Differences were considered significant at $p < 0.05$ as compared to control values.

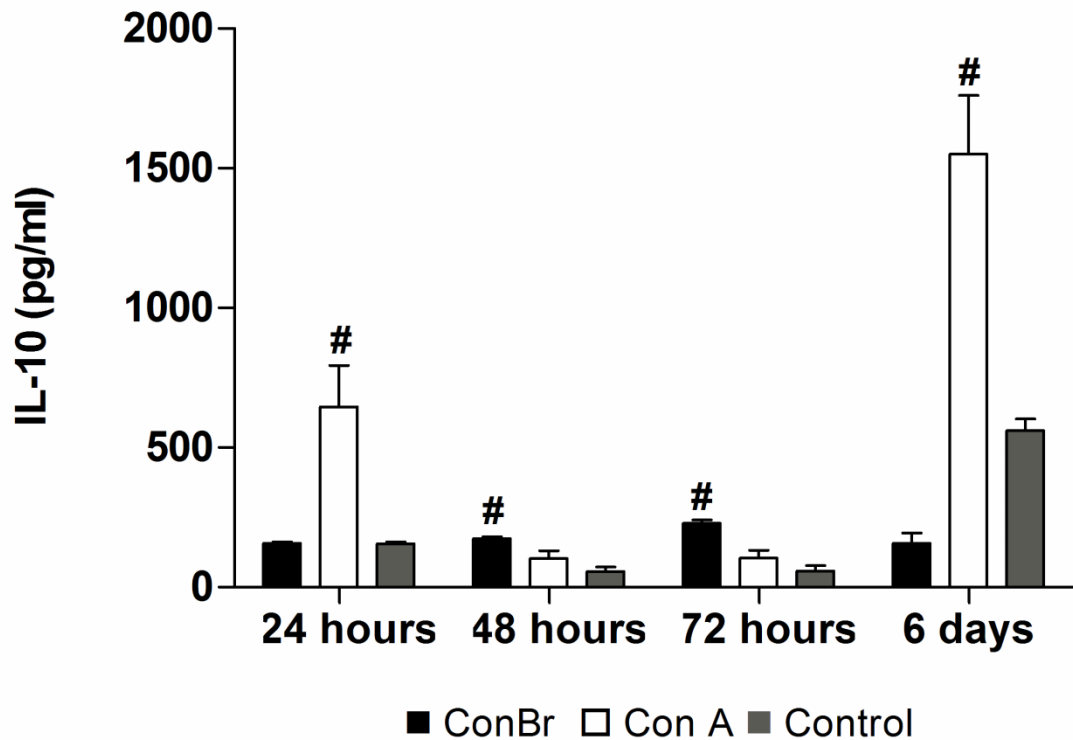


Fig. 5 IL-10 production in cells cultured with ConBr and ConA stimuli. Cells cultured, *in vitro*, with ConBr and ConA lectins at 24 h, 48 h, 72 h, and 6 days, respectively. ConA produced significantly higher IL-10 as compared to control values after 24 h and 6 days of culture. ConBr also induced higher IL-10 production and was superior to control and ConA cultures at 48 and 72 h. Values represent the mean \pm SD of six independent experiments per group. Differences were considered significant at $p < 0.05$ as compared to controls.

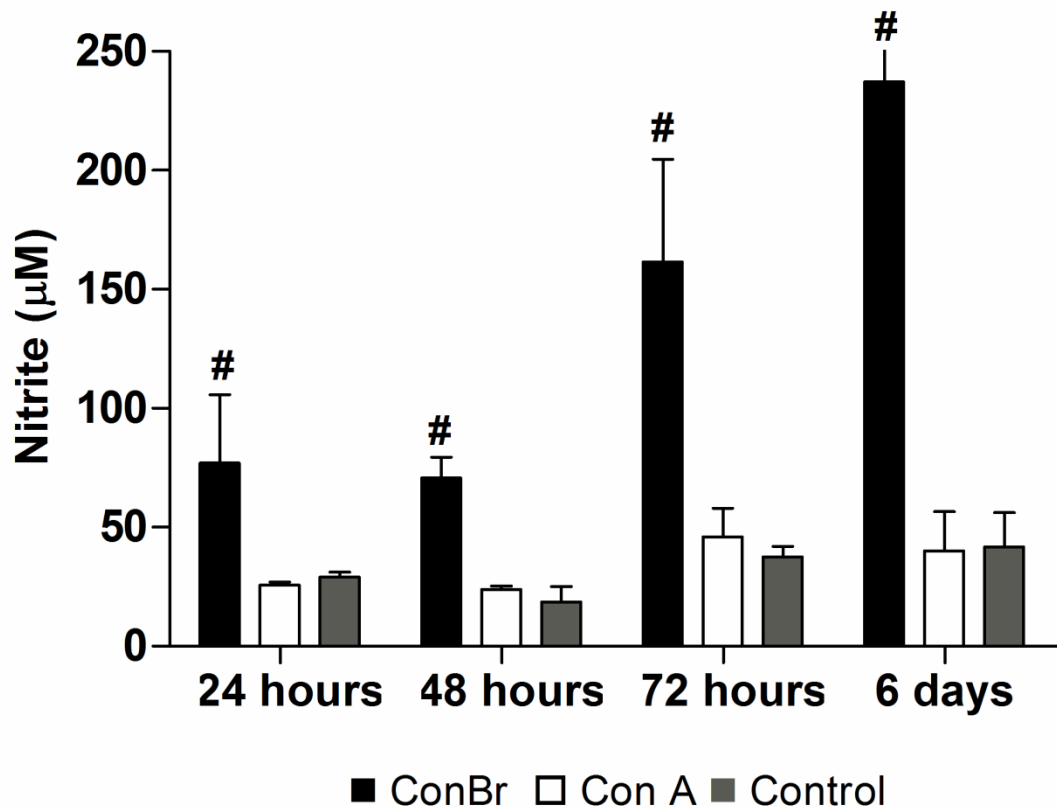


Fig. 6 NO production in Balb/c splenocytes treated with ConBr and ConA lectins. Splenocytes (10^6 cells/ml) were stimulated by ConA (2.5 $\mu\text{g/ml}$) and ConBr (2.5–10 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h, 48 h, 72 h, and 6 days. Non-stimulated cells were used as negative controls. Supernatants were collected, and the nitrite (NO) concentration from the supernatants was determined using the Griess reagent as described in the Materials and Methods. Data represent the means \pm SD of two independent observations performed in triplicate. Differences were considered significant at $p < 0.05$ as compared to the ConA positive control and negative control groups.

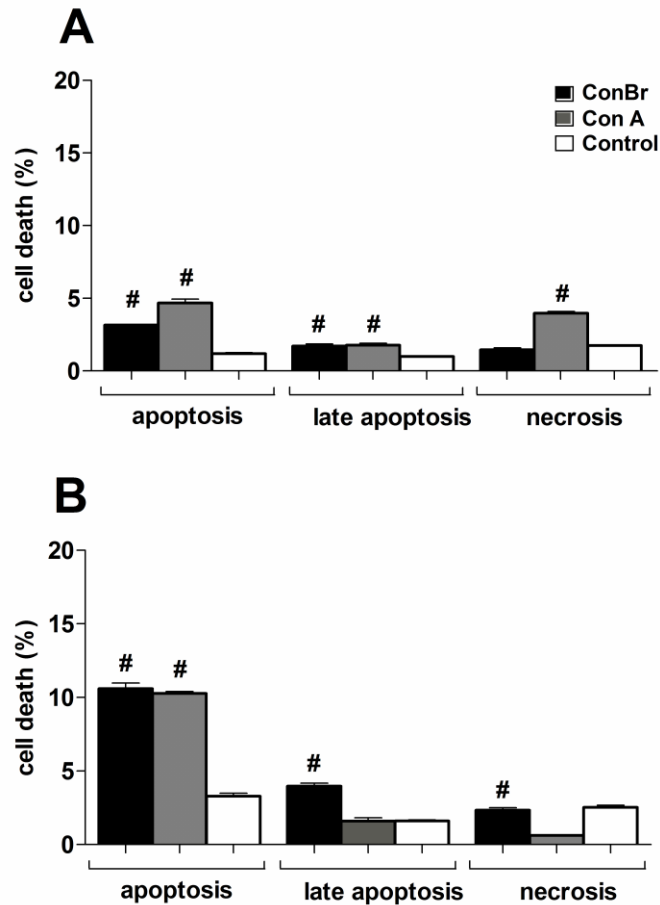


Fig. 7 The effect of lectins on splenocyte viability. **A**—cell death at 24 hours. ConBr and ConA induced increased apoptosis and late apoptosis as compared to the control. At the same time, ConA induced higher rates of necrosis as compared to ConBr and the control. **B**—cell death at 48 hours. ConBr induced increased apoptosis as compared to the control, late apoptosis as compared to the control and ConA, and necrosis only with respect to ConA, and not the control, at 48 hours. At the same time, ConA induced higher levels of necrosis as compared to the control. Values represent the mean \pm SD of five independent experiments per group. Differences were considered significant at $p < 0.05$ as compared to the controls.

4. CAPÍTULO 2: Atividades biológicas da ConBr, a lectina extraída das sementes da *Canavalia brasiliensis* Mart. ex. Benth.

**Atividade biológicas da ConBr, a lectina extraída das sementes da
*Canavalia brasiliensis***

**Flávio de Oliveira Silva^a, Priscila das Neves Santos^b, Benildo Sousa
Cavada^c, Ana Lúcia Figueiredo Porto^d**

^aDepartamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, Brazil, ^bCentro de Ciências biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brazil, ^dDepartamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil.

Correspondence Address: Ana Lúcia Figueiredo Porto, Laboratório de Tecnologia em Produtos Bioativos, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE, Phone: 55-81-3320-6345.

E-mail address: analuporto@yahoo.com.br

Lectina das sementes da *Canavalia brasiliensis*

A *Canavalia brasiliensis* Mart. ex Benth. é uma trepadeira pertencente a família Fabaceae, cujos indivíduos podem atingir de 0,5m a 5m, dependendo do porte (arbustivo ou arbóreo) da espécie suporte. As raízes são amarelas; as folhas alternadas, trifolioladas; as flores apresentam coloração roxa e as pétalas estão reunidas em inflorescências do tipo paniculada terminal, com escapo floral de coloração verde-arroxeadada. É conhecida popularmente como feijão-de-porco, feijão bravo ou feijão bravo do Ceará (Guedes et al., 2009).

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune que se ligam de maneira específica e reversível a carboidratos (Sharon 2007). A partir das sementes da *Canavalia brasiliensis* é extraída a ConBr, uma lectina que se liga a D-glicose/D-manose, sendo constituída de estruturas multiméricas feitas de monômeros idênticos de 25,5 kDa e que exibem equilíbrio dímero-tretâmero dependente do pH (Calvete et al., 1999; Cavada et al., 2001).

Nos últimos anos, a lectina ConBr tem sido foco de considerável interesse científico. A partir de seu isolamento e caracterização por Moreira e Cavada (1984), a lectina ConBr tem sido utilizada em diferentes modelos biológicos demonstrando ser uma molécula com potencial terapêutico. Nessa revisão, enfocamos estudos que utilizaram a ConBr, enfatizando a versatilidade dessa lectina.

Lectinas vegetais como agentes antitumorais

Ao longo dos anos muitos avanços foram alcançados no diagnóstico e tratamento do câncer, resultando em um aumento da sobrevivência dos pacientes, porém a busca por terapias mais eficientes permanece. Assim, se faz necessário à procura por drogas citotóxicas com maior especificidade às células cancerosas, e dentre as abordagens disponíveis, a utilização de lectinas como mediadoras do ataque às células alvo parece ser bastante promissora (Plattner et al., 2008).

As lectinas são excelentes candidatas ao diagnóstico do câncer, devido a sua capacidade de se ligar à membrana de células tumorais, bem como à terapia do câncer, por apresentarem efeitos citotóxicos (diminuindo a síntese protéica e induzindo

apoptose), antiproliferativos e imunoestimulatórios, levando a produção de citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Medja e Prisecaru, 2005).

Estudos histoquímicos têm demonstrado que alterações quantitativas e qualitativas são observadas em glicoproteínas durante o processo oncogênico (Bafna et al., 2008; Ghazarian et al., 2011). No câncer de cólon, estas alterações incluem uma diminuição do conteúdo de carboidrato do glicocálix, o que modifica a relação entre carboidratos e proteínas. Sabe-se que a glicosilação alterada constitui uma via universal para transformações malignas e progressão do tumor. Lectinas possuem a habilidade de reconhecer açúcares específicos, o que as tornam candidatas ideais para detectar modificações de carboidratos na superfície celular de transformações malignas, diferenciação de células tumorais e metástase (Gemeimer et al., 2009).

Dentro deste contexto, lectinas podem ser utilizadas para investigar alterações na glicosilação durante processos normais e patológicos e para gerar novos conhecimentos, contribuindo com novas técnicas para detecção destas alterações (Ghazarian et al., 2011).

Pinto et al., (2010) avaliaram o potencial de lectinas da família Diocleinae como marcadores para células de cancer de cólon humano. As lectinas das sementes de *Canavalia ensiformis* (ConA), *Canavalia brasiliensis* (Con Br), *Canavalia bonariensis* (Con Bo), *Canavalia grandiflora* (Con Gr), *Canavalia maritima* (Con M), *Dioclea grandiflora* (DGL), *Dioclea guianensis* (Dgui), *Dioclea virgata* (Dvir), *Dioclea violacea* (Dvio) e *Dioclea rostrata* (Dros) foram utilizadas no estudo e exibiram perfis distintos de interação com a linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano LS-180.

Algumas das lectinas foram capazes de se ligar as células estudadas, o que sugere que estas proteínas reconhecem alterações sutis presentes nos resíduos de carboidratos das membranas celulares. Estas diferenças poderiam ser causadas pela presença de glicoreceptores distintos, níveis diferentes de sua expressão na superfície celular, ou ainda por uma discrepância no perfil de afinidade destas lectinas na relação com estes receptores.

Björknesjö (2011) avaliou a atividade antiproliferativa e a indução de apoptose das lectinas Concanavalin A (ConA), *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Canavalia boliviana* (ConBol) associadas a nanotubos de carbono na linhagem celular de

adenocarcinoma de colorretal (HT-29). Para tanto, foi avaliada a citotoxicidade das mesmas quando em contato com as células tumorais. O estudo demonstrou que as lectinas ConA, ConBr e ConBol possuem o potencial de induzir efeitos citotóxicos nas células tumorais HT-29 no período de 48 e 72 h em concentrações de 50 - 100 µg/mL. Porém, em relação a interação entre a ConBr e as células tumorais, os autores observaram que a ConBr não se ligou à membrana celular.

Uso da ConBr como marcador biológico

O efeito da suplementação dos meios de produção *in vitro* de embriões com lectinas vem despertando o interesse de muitos pesquisadores. Komninou et al., (2011) avaliaram os padrões de ligação das lectinas *Canavalia ensiformis* (ConA), *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Canavalia boliviana* (ConBol), conjugadas à isotiocianato de fluoresceína (FITC), à oócitos bovinos, durante o período de maturação *in vitro*.

A lectina ConBr, apesar de possuir 99% de identidade, em sequência de aminoácidos, e a princípio exibir a mesma especificidade para glicose/manose que a lectina ConA (Cavada et al., 2011), apresentou uma intensidade de fluorescência bem menos intensa, do que as lectinas ConA e ConBol, caracterizando-se por demonstrar um padrão fraco de ligação à zona pelúcida e às células do cumulus. Os autores concluíram que o alto potencial de ligação das lectinas com os carboidratos presentes na superfície dos oócitos merece atenção especial em estudos futuros, pois estes carboidratos são potenciais receptores de modulação de atividade celular e, além disso, podem mediar a interação com outras células, nutrientes e drogas utilizadas em cultivo *in vitro*.

Respostas celulares induzidas pela ConBr

O efeito estimulante de mitógenos derivados de plantas (lectinas) tem sido demonstrado em diferentes subpopulações de células animais.

Os primeiros estudos envolvendo a resposta celular induzida pela presença da lectina foram realizados por Rodriguez et al., (1992). Os autores observaram que a administração intraperitoneal da lectina ConBr estimulou o aumento do número de

células mononucleares e de polimorfonucleares em camundongos, resposta que eles atribuíram ao efeito estimulatório da lectina. Após os resultados obtidos nesse estudo, novos experimentos foram realizados afim de se observar a capacidade estimulatória da lectina ConBr em outros modelos experimentais.

Bento et al., (1993) analisaram o capacidade da ConBr de induzir o edema de pata e a migração de células para a cavidade peritoneal. Em resposta ao estímulo provocado pela lectina, os autores observaram o desenvolvimento da reação inflamatória, a qual alcançou a resposta máxima após 6 horas de observação. A injeção intraperitoneal da ConBr promoveu a migração de células inflamatórias, neutrófilos e células mononucleares para a cavidade abdominal dos animais.

Andrade et al., (1999) verificaram a produção de óxido nítrico por células obtidas após lavagem da cavidade abdominal de camundongos cultivadas com ConBr e avaliaram também o efeito do estímulo causado pela lectina em células coletadas de animais após a injeção peritoneal da lectina (100 µg/animal). Os autores observaram que a resposta induzida pela presença da lectina ocorreu de maneira dose-dependente alcançando uma resposta máxima na concentração de 10µg/ml. De acordo com os autores, a produção de NO ocorreu através da estimulação direta da lectina sobre os macrófagos e indireta por meio da ação de linfócitos ativados.

O efeito da lectina ConBr sobre a liberação de histamina foi observado por Gomes et al., (1994) em mastócitos de ratos e Lopes et al., (2005) em mastócitos de ratos e hamsters obtidos por meio de lavagem abdominal do animais. Os autores demonstraram que a liberação de histamina induzida pela lectina foi dependente da presença de íons cálcio e reduziu quando a lectina foi solubilizada em solução saturada de glicose.

A capacidade estimulatória da ConBr *in vivo* foi analisada por Barbosa et al., (2001). Os autores verificaram um efeito estimulatório da lectina em células do linfonodo poplíteo, caracterizada pelo aumento das regiões paracortical e interfolicular dos nódulos linfáticos, as quais apresentaram linfoblastos e células em divisão. Além disso, a lectina promoveu apoptose celular nas áreas onde houve a proliferação celular.

Estudos também demonstram que o efeito estimulatório da ConBr sobre células animais é acompanhado pela produção de citocinas. Reis et al., (2008) verificaram que

células sanguíneas mononucleares periféricas de pacientes infectados e não infectados pelo *Schistosoma mansoni*, produzem IL-5, IL-10, IFN- γ e TNF- α , quando cultivadas na presença da lectina.

Silva et al., (2011) observaram a proliferação de esplenócitos murinos cultivados na presença da ConBr. Os autores verificaram que o estímulo induzido pela lectina foi acompanhado pela produção de citocinas como IL-2, IL-6, IL-10 e IFN- γ . Além disso, as células tratadas com a ConBr produziram óxido nítrico, um metabólito envolvido na resposta celular que apresenta efeitos citostáticos ou citotóxico frente a células tumorais e que está relacionado com a apoptose celular.

Aplicação odontológica

As mais prevalentes desordens dentais estão relacionadas com a cárie e doença periodontal, onde os micro-organismos presentes no biofilme dental atuam como principais agentes responsáveis. A formação do biofilme ocorre através de um processo ordenado e dinâmico onde há necessidade da fixação e proliferação de bactérias sobre as superfícies dos dentes, a aderência bacteriana à película adquirida representa um dos primeiros mecanismos envolvidos na iniciação do desenvolvimento do biofilme dental (Pereira et al., 2006).

A caracterização estrutural de lectinas vegetais revelou a presença de locais de ligação específicos que reagem com os carboidratos expostos na superfície de micro-organismos, possibilitando a identificação de bactérias patogênicas com base na aglutinação seletiva entre as lectinas e as bactérias (Oliveira et al, 2008).

Micro-organismos formam um biofilme patogênico aderido a superfícies dentárias, produzindo ácido e produtos citotóxicos que levam à desmineralização de tecidos dentários. A colonização da superfície é um passo essencial no desenvolvimento do biofilme. A habilidade dos patógenos orais em aderir superfícies dentárias está diretamente ligada à presença de moléculas específicas que podem interagir com ligantes do esmalte da película adquirida.

Cavalcante et al. (2011) verificaram a atividade inibitória e antibiofilme de lectinas da subtribo Diocleinae contra *Streptococcus mutans* e *Streptococcus oralis*. Foram utilizadas as lectinas de *Canavalia ensiformis* (ConA), *Canavalia brasiliensis* (ConBr),

Canavalia maritima (ConM), *Canavalia gladiata* (CGL) e *Canavalia boliviana* (ConBol). ConBol, ConBr e ConM apresentaram atividade inibitória no crescimento de *S. mutans*. Todas as lectinas, à exceção de ConA, estimularam significativamente o crescimento de *S. oralis*. Os resultados mostraram uma inibição na formação do biofilme de *S. mutans* e não o mesmo efeito em *S. oralis*, o que poderia ser atribuído a diferenças de carboidratos de superfície entre espécies de bactérias. Sendo assim, os autores acreditam que o local de ligação do carboidrato na superfície da bactéria provavelmente possui um papel chave na atividade antibacteriana, sendo responsável pelo reconhecimento da bactéria.

Teixeira (2006) utilizaram a micrografia de fluorescência para visualizar a habilidade de lectinas marcadas com FITC de ligarem-se à película adquirida. As lectinas extraídas de *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea violacea*, *Dioclea grandiflora*, *Cratylia floribunda* e *Vatairea macrocarpa* foram capazes de inibir a aderência de cinco espécies de *streptococcus* à película adquirida *in vitro*. Porém, verificou-se que as lectinas ligadoras de glicose/manose se ligaram mais fortemente que a lectina ligadora de galactose (*Vatairea macrocarpa*).

Efeitos sobre o sistema nervoso

No sistema nervoso central de mamíferos, as lectinas com afinidade para manose/glicose ou galactose podem modular diversos aspectos da comunicação celular. Estudos têm sido realizados com o objetivo de se verificar que efeitos as lectinas vegetais apresentam sobre o sistema nervoso.

Baraúna et al., (2006) verificaram que quando administrada centralmente, a lectina ConBr produziu uma diminuição no tempo de imobilidade no teste do nado forçado (TNF) em camundongos. O TNF é um modelo comportamental largamente utilizado na busca de compostos ou drogas com ação antidepressiva. Estudos têm demonstrado que a modulação dos sistemas serotoninérgico, noradrenérgico e dopaminérgico, entre outros, estão envolvidos com os efeitos comportamentais dos antidepressivos no TNF. Os resultados da aplicação intracérebroventricular indicaram um efeito anti-depressivo da ConBr com envolvimento do sistema monoaminérgico.

Russi et al., (2012) investigaram os efeitos neuroprotetores da lectina ConBr em modelos animais de toxicidade glutamatérgica, após a introdução da ConBr por via intracérebroventricular (10µg/sítio, i.c.v). Os autores observaram que a lectina reduziu as crises tônico-clônicas induzidas pelo agonista de receptores N-Metil D-aspartato, ácido quinolínico, produzindo um percentual de proteção de 58%. A ConBr também diminuiu significativamente a severidade das convulsões, sem alterar a latência para a primeira convulsão nem o tempo de duração da crise convulsiva. O efeito neuroprotetor de ConBr foi dependente de sua integridade estrutural e de sua capacidade de ligação à resíduos de oligossacarídeos uma vez que a ConA, uma lectina que tem alta homologia com ConBr, não foi capaz de produzir atividade neuroprotetora, sendo a atividade neuroprotetora máxima observada na concentração de 10µg/ml. Os autores concluíram que a lectina ConBr é capaz de exercer uma ação moduladora sobre receptores N-Metil D-Aspartato, inibindo sua atividade e dessa forma produzindo neuroproteção.

Efeito sobre a cicatrização de lesões cutâneas

Apesar da disponibilidade de recursos disponíveis que auxiliem no processo de cicatrização de lesões cutâneas, existe a necessidade da busca por novos fármacos que sejam mais eficazes em processos de difícil cicatrização como lesões de pacientes diabéticos e úlceras crônicas.

Foi demonstrado por Silva et al., (2009) que a ConBr favorece o processo cicatricial. Através de lesões cutâneas experimentais em camundongos, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as áreas médias das feridas dos grupos tratados com a ConBr e os demais grupos analisados na fase de fibroplasia, sugerindo que a ConBr, quando aplicada topicamente, promove a ativação de células envolvidas no processo cicatricial, favorecendo a evolução do mesmo. Os autores concluíram que a lectina isolada das sementes da *Canavalia brasiliensis* induz a síntese de proteases com atividade colagenolítica durante a cicatrização das lesões cutâneas, podendo a partir desse mecanismo promover o processo cicatricial.

Efeito sobre a glicemia

Em acréscimo às diversas atividades biológicas demonstradas pelas lectinas, existem consideráveis evidências do envolvimento destas proteínas com receptores insulínicos. Tem sido divulgado cientificamente que o receptor de insulina localizado na membrana plasmática de células alvo é uma glicoproteína, e ainda, o pré-tratamento de células ou membranas com glicosidases ou com lectinas leva a uma redução da ligação destes receptores à insulina.

Mesquita et al., (2005) demonstraram que o tratamento utilizando a ConBr em ratos com diabetes induzida levou a reduções significativas nos níveis de glicose sanguínea com variações dependentes da via de administração. Após a administração da ConBr por via oral e intraperitoneal observou-se redução de 16% e 7%, respectivamente. A injeção endovenosa de ConBr reduziu os níveis glicêmicos os animais em 15%. Assim a lectina exerce um efeito modulador de ratos diabéticos, dependente da via de administração.

Atividade inseticida

Para lidar com a ameaça contínua de diferentes insetos fitófagos, as plantas desenvolveram variados mecanismos de defesa, os quais incluem características morfológicas e estruturais, bem como a síntese de compostos químicos. Entre os produtos químicos sintetizados pelas plantas em resposta a presença de patógenos estão os peptídeos de baixo peso molecular e proteínas que possuem atividade inseticida contra insetos-praga (Vandenborre et al., 2009). Exemplos de tais proteínas são os inibidores de tripsina, as quitinases e as lectinas (Carlini and Grossi-de-Sa, 2002).

Pesquisas demonstram que lectinas de plantas possuem especificidades contra glicoconjugados como galactose e ácido siálico, os quais estão presentes em células de organismos que não pertencem ao reino vegetal, como micro-organismos, nematódeos e insetos fitófagos, e que estes carboidratos são pouco presentes ou ausentes em plantas, o que indica que elas fariam parte do sistema de defesa vegetal (Wong et al., 2010), dessa forma, as lectinas possuem um potencial uso como fitoinseticidas,

apresentado efeitos entomotóxicos quando ingeridas por insetos das ordens Coleoptera, Homoptera e Lepdoptera (Peumans e Van Damme,1995).

Uma importante característica das lectinas vegetais é a sua resistência à hidrólise por enzimas presentes no trato gastrointestinal dos animais. Isto permite que elas se liguem a resíduos glicosilados presentes nas membranas das células que revestem o trato digestivo. Como resultado dessa interação, ocorrem uma série de eventos prejudiciais ao organismo animal, o que confere a esse de proteínas uma propriedade antinutricional e/ou tóxica. Entre os efeitos adversos provocados pelas lectinas, destacam-se o aumento de volume das células epiteliais do intestino e danos a membrana luminal do trato digestivo, levando a prejuízos na digestão e absorção de nutrientes. Além disso, as lectinas causam mudanças na flora intestinal, modulando o estado imunológico do trato digestivo (Oliveira e Vasconcelos, 2004).

Freitas et al., (2011) demonstraram que a ConBr possui atividade inseticida sobre *Cadllosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) causando efeitos deletérios sobre o desenvolvimento das larvas deste inseto quando utilizadas nas concentrações de 1% e 2% (p/p). Os autores também verificaram que a ConBr é resistente a ação hidrolítica de proteases intestinais de larvas de *C. maculatus*, sugerindo que a habilidade dos insetos para digerir as lectinas parece estar diretamente relacionada ao efeito inseticida observado.

O efeito deletério de várias lectinas vegetais, purificadas de plantas pertencentes a diferentes famílias botânicas tem sido investigado, principalmente sobre insetos pertencentes às ordens Coleoptera, Homoptera e Lepidoptera. A avaliação dos efeitos de lectinas tem sido realizada principalmente mediante a incorporação das proteínas purificadas em dietas artificiais específicas para cada espécie. Isidro (2001) investigou a ação da ConBr sobre o comportamento da saúva do nordeste (*Atta opaciceps* Borgmeier, 1939) (Hymenoptera:Formicidae). Nos ecossistemas brasileiros a saúva destaca-se como inseto abundante, não só pela densidade de saueiros nas áreas infestadas, como também, pelo elevado número de espécimes por saueiro. ConBr influenciou os tipos de comportamentos, através das diferentes doses e horários estudados nos bioensaios.

Conclusões

A lectina ConBr tem sido utilizada em variados modelos biológicos demonstrando possuir um importante potencial biotecnológico e terapêutico. Com base nos estudos realizados, observa-se que esta é uma lectina com características farmacológicas que devem ser melhor avaliadas com o objetivo de sua utilização futura como uma ferramenta biotecnológica ou um fármaco.

Referências

ANDRADE, J. L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M. V.; CAVADA, B. S.; BARRAL-NETTO, M. Lectin-Induced Nitric Oxide Production. **Cellular Immunology**, v. 194, n. 1, p. 98-102, May, 1999.

BAFNA, S.; SINGH, A. P.; MONIAUX, N.; EUDY, J. D.; MEZA, J. L.; BATRA, S. K. MUC4, a Multifunctional Transmembrane Glycoprotein, Induces Oncogenic Transformation of NIH3T3 Mouse Fibroblast Cells. **Cancer Research**, v. 68, n. 22, p. 9231-9238, Nov. 2008.

BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T. B.; FREITAS L. A. R.; BARRAL NETTO, M. *In vivo* lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 673-678, July, 2001.

BARAÚNA, S. C.; KASTER, M. P.; HECKERT, B. T.; do NASCIMENTO, K. S.; ROSSI, F. M.; TEIXEIRA, E. H.; CAVADA, B. S.; RODRIGUES, A. L.; LEAL R. B. Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 85, n. 1, p. 160-169, Sept. 2006.

BENTO, C.A.; CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T.; MOREIRA, R. A.; BARJA-FIDALGO, C. Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. **Agents Actions**,; v. 38, n. 1-2, p. 48-54, Jan. 1993.

BJÖRKNESJÖ, S.; NEDEL, F.; COLLARES, T.; CAVADA, B.; SEIXAS, F. K. Atividade antiproliferativa de lectinas associadas a nanotubos de carbono em células de adenocarcinoma de cólon (HT-29). *XX Congresso de Iniciação Científica - Ano 2011 - UFPEL - Universidade Federal de Pelotas*. Disponível em: http://www.ufpel.edu.br/cic/2011/anais/pdf/CS/CS_00933.pdf acesso em: 25 de março de 2012.

CALVETE, J.J.; THOLE, H.H.; RAIDA, M.; URBANKE, C.; ROMERO, A.; GRANGEIRO, T.B.; RAMOS, M.V.; ROCHA, I.M.A.d.; GUIMARAES, F.N.; CAVADA, B.S. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1430, n. 2, p. 367–375, Mar.1999.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SA, M. F.. Review plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potential as bioinsecticides. **Toxin**, v. 40, n. 11, p. 1515–1539, Nov. 2002.

CAVADA, B.S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T.B.; BARRAL-NETTO, M.; Revisiting proteus: do minor change in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. *Current Protein and Peptide Science*, v. 2, n. 2, p. 123–135, June, 2001.

CAVALCANTE, T. T. A; da ROCHA, B. A. M.; CARNEIRO, V. A.; ARRUDA, F. V. S.; do NASCIMENTO, A. S. F.; SÁ, N. C.; do NASCIMENTO, K. S.; CAVADA B. S.; TEIXEIRA, E. H.; Effect of lectins from Diocleinae subtribe against oral Streptococci. **Molecules**, v. 16, n. 5, p. 3530-3543, Apr. 2011.

de MEJÍA, E. G.; PRISECARU, V. I. Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment. *Critical Reviews and Food Science and Nutrition*, v. 45, n. 6, p. 425–445, Jan. 2005.

FREITAS, C. D. T.; RAMOS, M. V.; SOUZA, D. P.; MARINHO-FILHO, J. D. B.; TEIXEIRA, F. M.; OLIVEIRA, J. S. Correlações entre atividade inseticida e resistência a proteólise de duas lectinas vegetais glicose/manose. **Comunicata Scientiae**, v. 2, n. 1, p. 34-41, ago. 2011.

GEMEINER, P.; MISLOVIČOVÁ, D.; TKÁČ, J.; ŠVITEL, J.; PÄTOPRSTÝ, V.; HRABÁROVÁ, E.; KOGAN, G.; KOŽÁR, T. Lectinomics II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 1-15, janeiro – Feb. 2009.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER S. B. A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemica**, v. 113, n. 3, p. 236-247, May, 2011.

GOMES, J. C.; FERREIRA, R. R.; CAVADA, B. S.; MOREIRA R. A.; OLIVEIRA, J. T. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with concanavalin A. **Agents Actions**, v. 41, n. 3-4, p. 132-135, May, 1994.

GUEDES, R.S; ZELMA GLEBYA MACIEL QUIRINO, Z. G. M.; GONÇALVES, E. P. Fenologia reprodutiva e biologia da polinização de *Canavalia brasiliensis* Mart. ex Benth (Fabaceae). **Biotemas**, v. 22, n. 1, p. 27-37, mar. 2009.

ISIDRO, R.; SALES, F. J. M.; CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T. B.; MOREIRA, R. A. Ação de lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* Mart. sobre o comportamento da saúva do nordeste, *Atta opaciceps* Borgmeier, 1939. Revista da Faculdade de Agronomia, v. 27, p. 77-86, June, 2001.

LOPES, F.C.; CAVADA, B. S.; PINTO, V. P.T; SAMPAIO, A.H.; GOMES, J. C. Differential effect of plant lectins on mast cells of different origins on the histamine release induced by plant lectins. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 38, n. 6, p. 935-941, June, 2005.

MESQUITA, R. O.; ARAGÃO, K. S.; BITENCOURT, F.S.; SILVESTRE, P. P.; VASCONCELOS, M. P.; NASCIMENTO, K. S.; BENEVIDES, R. G.; VALE, M. R.; CAVADA, B. S.; ALENCAR, N. M. N. Lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) reduz a glicemia em ratos diabéticos. Anais da 57ª Reunião Anual da SBPC - Fortaleza, CE - Julho/2005.

MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation, characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum**, v. 26, n. 2, p. 113-120, 1984.

OLIVEIRA, M. D. L.; ANDRADE, C. A. S.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; COELHO, L. C. B. B.; TEIXEIRA, J. A.; CARNEIRO-da-CUNHA M. G.; CORREIA, M. T. S. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. Seeds and its potential antibacterial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v.46, n. 3, p. 371–376, Mar. 2008.

PLATTNER, V.E.; WAGNER, M.; RATZINGER, G.; GABOR, F.; WIRTH, M. Targeted drug delivery: binding and uptake of plant lectins using human 5637 bladder cancer cells. **European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceuticals**, v. 70, n. 2, p. 572-576, June, 2008.

PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V.; SAMPAIO, F. C.; SAMPAIO, M. C. C.; ALVES, P. M.; ARAÚJO, C. R. F.; HIGINO, J. S. Efeito antibacteriano e antiaderente *in vitro* do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre micro-organismos do biofilme dental. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 88-93, Jan./Mar. 2006.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, n. 2, p. 347-352. Oct. 1995.

PINTO, V. P. T.; TEIXEIRA, E. H.; TEIXEIRA, A. H.; CARNEIRO, V. A.; CRISTINO-FILHO, G.; DUS, D.; DEBRAY, H.; SAMPAIO, A. H.; CAVADA, B. S.; Lectins isolated from Brazilian beans as markers of membrane glycoconjugates of human colon cancer cells. **Journal of Cancer Research and Experimental Oncology**, v. 2, n. 5, p. 54-59, Dec. 2010.

REIS, E. A.; ATHANAZIO, D. A.; CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H.; de PAULO TEIXEIRA PINTO, V.; CARMO, T. M.; REIS, A.; TROCOLLI, G.; CRODA, J.; HARN, D.; BARRAL-NETTO, M.; REIS, M. G. Potential immunomodulatory effects of plant lectins in

Schistosoma mansoni infection. **Acta Tropica**, v.108, n. 2-3, p.160-165, Nov./Dec. 2008.

RODRIGUEZ, D.; CAVADA, B.S.; ABREU DE OLIVEIRA, J.T.; De AZEVEDO MOREIRA, R.; RUSSO, M. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25, n. 8, p. 823-826, 1992.

RUSSI, M. A.; VANDRESEN-FILHO, S.; RIEGER, D. K.; COSTA, A. P.; LOPES, M. W.; CUNHA, R. M.; TEIXEIRA, E. H.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; TASCA, C. I.; LEAL, R. B. ConBr, a lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds, protects against quinolinic acid-induced seizures in mice. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 2, p. 288-297, Feb. 2012

SHARON, N. Carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 5, p. 2753–2764, Feb. 2007.

SILVA, F. O.; ARAÚJO, R. V. S.; SCHIRATO, G. V.; TEIXEIRA, E. H.; de MELO JÚNIOR, M. R.; CAVADA, B. S.; LIMA-FILHO, J. L.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; PORTO, A. L. F. Perfil de proteases de lesões cutâneas experimentais em camundongos tratadas com a lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 6, p. 1808-1814, set. 2009.

SILVA, .F. O.; SANTOS, P. N.; MELO, C. M. L.; TEIXEIRA, E. H.; CAVADA, B. S.; ARRUDA, F. V.; CAJAZEIRAS, J. B.; ALMEIDA, A. C.; PEREIRA, V. R. A.; PORTO, A. L. F. Immunostimulatory activity of ConBr: a focus on splenocyte proliferation and proliferative cytokine secretion. **Cell and Tissue Research**, v. 346, n. 2, p. 237-244, Nov. 2011.

TEIXEIRA, E.H.; NAPIMOGA, M. H.; CARNEIRO, V. A.; de OLIVEIRA, T. M.; CUNHA, R. M.; HAVT, A.; MARTINS, J. L.; PINTO, V. P.; GONÇALVES, R. B.; CAVADA, B. S. *In vitro* inhibition of Streptococci binding to enamel acquired pellicle by plant lectins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 1 p. 111-116. July, 2006

VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, v. 44, n. 4, p. 385-403, Sept. 2004.

WONG, J. H.; NG, T.B.; CHEUNG, R. C.; YE, X. J.; WANG, H. X.; LAM, S. K.; LIN, P.; CHAN, Y. S.; FANG, E. F.; NGAI, P. H.; XIA, L. X.; YE, X. Y.; JIANG, Y.; LIU, F. Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 87, n. 4, p. 1221–1235, July, 2010.

5. CAPÍTULO 3: Antiproliferative effect induced by ConBr lectin on B16F10 cells

ARTIGO A SER SUBMETIDO NO PERIÓDICO CELL AND TISSUE RESEARCH

Fator de impacto: 2.8



Antiproliferative effect induced by ConBr lectin on B16F10 cells

Flávio de Oliveira Silva^a, Priscila das Neves Santos^b, Evellyne Oliveira Figueirôa^c, Cristiane Moutinho Lagos de Melo^c, Juliana Kelle de Andrade Lemoine Neves^c, Francisco Vassiliepe Sousa Arruda^d, João Batista Cajazeiras^d, Kyria Santiago do Nascimento^d, Edson Holanda Teixeira^e, Benildo Sousa Cavada^e, Valéria Rêgo Alves Pereira^c and Ana Lúcia Figueiredo Porto^a

^aDepartamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, Brazil, ^bCentro de Ciências biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brazil, ^cDepartamento de Imunologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ-UFPE, Pernambuco, Brazil, Biomol-Lab, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil, ^eDepartamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil.

Correspondence Address: Ana Lúcia Figueiredo Porto, Laboratório de Tecnologia em Produtos Bioativos, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE, Phone: 55-81-3320-6345.
E-mail address: analuporto@yahoo.com.br

Abstract

Lectins are proteins or glycoproteins that present the ability to link, in a specific and reversible manner, to carbohydrate at cell surface. Early studies demonstrate that lectins are potential immunomodulator and antitumour agents. This study aims to evaluate the effect of lectin extracted from seeds of *Canavalia brasiliensis* (ConBr) in murine melanoma B16F10 cells, through cell viability analysis, apoptosis index, cell migration and production of IL-12 and nitric oxide (NO). Results showed that ConBr was able to reduce cell viability promoting apoptosis, which could be observed by decrease of cell migration. ConBr also induced NO and IL-12 synthesis, showing a possible therapeutic potential for this kind of tumour.

Keywords: ConBr, *Canavalia brasiliensis*, glucose/manose binding lectin, murine melanoma

Introduction

Lectins are known as carbohydrate-binding proteins that can bind carbohydrates reversibly and possess the ability to agglutinate cells or precipitate polysaccharides and glycoconjugates (Sharon, 2007). They are widely distributed in nature and can be found in plants, animals, algae, humans and microorganisms and virus. In the plant kingdom, seeds have been known to be a rich source of lectins, comprising up to 10% of total protein, and for this, plant lectins are the most thoroughly investigated, especially the Leguminosae family (Sanz-Aparicio et al., 1997).

Legume lectins are a large group of structurally similar proteins with distinct carbohydrate specificities (Cavada et al., 2001). *Canavalia brasiliensis* seeds lectin (ConBr), is a mannose/glucose specific-lectin, as other Diocleinae lectins, is constituted of multimeric structures made of identical monomers of 25.5 kDa exhibiting a pH-dependent dimer/tetramer equilibrium (Calvete et al., 1999; Cavada et al., 2001).

Induction of apoptosis has been recognized as one ideal strategy for cancer chemotherapy. Agents with the ability to induce apoptosis in tumors have the potential to be used for antitumor therapy (Reed 2003). In recent years, plant lectins have been widely reported to possess markedly inhibitory effect or cytotoxicity and induce apoptosis in a variety of typical tumor cells.

Many legume lectins, which belong to the most extensively studied plant lectin family, have been reported to possess remarkable antiproliferative activity and/or apoptosis-inducing effect on the growth of cancer cells (e.g., *Vicia faba* agglutinin, *Sophora flavescens* lectin and *Phaseolus coccineus* lectin) (Jordinson et al., 1999; Liu et al., 2008; Chen et al., 2008; Chen et al., 2009).

ConBr has previously been shown to induce the following effects: proliferation and IFN- γ production in cultured peripheral blood mononuclear cells (Barral-Netto et al., 1992); nitric oxide (NO) production by murine macrophages *in vitro* and *in vivo* (Andrade et al., 1999); *in vivo* lymphocyte activation and apoptosis (Barbosa et al., 2001); IFN- γ , IL-10, IL-4, granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), and TNF- α production in human peripheral blood mononuclear cells (Cavada et al., 2001); histamine release from mast cells (Lopes et al., 2005) and proliferative effect on murine splenocytes and cytokine production (Silva et al., 2011). This study aimed to evaluate biological effect of ConBr over murine melanoma cells by analyzing its action on cell viability, tumour cell migration and nitric oxide and cytokine production.

Materials and methods

Plant material and cell culture

Canavalia brasiliensis lectin (ConBr) was purified as described previously (Moreira e Cavada, 1984). The murine melanoma B16F10 cells were purchased from Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). They were routinely cultured in RPMI-1640 medium containing 10% fetal bovine serum, 100 U/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin, and 2 mM L-glutamine in a humidified cell incubator with an atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C.

Cell viability assay

The murine melanoma B16F10 cells were dispensed in 96-well flat bottom microtiter plates at a density of 5×10^3 cells/ml. After 24 h incubation, medium was then

replaced with medium containing 1% fetal bovine serum with ConBr at various concentrations (2.5, 5.0, 10, 25, 50 and 100 µg/ml) for 24 and 48 h. Cell viability was measured by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay as described previously (Mosman, 1983). After removing the supernatants, 20 µl of MTT and 180 µl of medium were added and incubated at 37 °C for 4h. Again the supernatant was carefully removed and 150 µl of dimethyl sulphoxide (DMSO) was added into each well to dissolve the MTT formazan at the bottom of the wells. After 10min, absorbance at 490 nm was recorded using a spectrophotometer [Model 3550 Microplate Reader (BIO-RAD)]. The percentage of cell growth inhibition was calculated as follows: cell proliferation inhibition (%) = $(A_{490, \text{control}} - A_{490, \text{sample}}) / (A_{490, \text{control}} - A_{490, \text{blank}}) \times 100$.

Flow cytometry analysis

The levels of apoptosis 24 and 48 h after ConBr (2.5, 5.0, 10, 25, 50 and 100 µg/ml) treatments were examined to monitor cell recovery. Annexin V binding and propidium iodide staining were determined using flow cytometry. The cells were washed with ice-cold phosphate-buffered saline PBS and double stained with FITC-coupled Annexin V protein and propidium iodide for 20 min. Flow cytometry was performed using a 488-nm laser coupled to a cell sorter (FacsCalibur; BD Biosciences, Mountain View, CA, USA). The results were analysed using dot plots. Double negatives (Annexin-FITC⁻/PI⁻) were considered viable cells. Annexin-FITC⁺/PI⁻ represented B16F10 cells in the early stages of apoptosis. Double positives (Annexin-FITC⁺/PI⁺) represented spleen cells in the late stages of apoptosis, and PI⁺ cells were considered to be necrotic.

Cell migration assay

For analysis of cell migration, the murine melanoma B16F10 cells (10^6 cell/ml) were grown in 24 well plates with different concentrations (2.5, 5.0, 10, 25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$) of ConBr for 24 h. Cells were observed in an inverted light microscope and images were captured (at 0 and 24 h) for later analysis.

Cytokine determination

The murine melanoma B16F10 cells were cultured on 24-well plates at a density of 10^6 cells/well. Cytokines were quantified at 24 h and 48 h in the supernatants of cultures stimulated with ConBr at 2.5, 5.0, 10, 25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$, or maintained only in the culture medium (negative control). Culture supernatants were collected, and the concentrations of the cytokines (IL-12) present in the supernatants were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay from Kit OptEIA (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), according to the manufacturer's instructions.

Determination of nitric oxide (NO) Production

The murine melanoma B16F10 cells were used to evaluate nitrite concentration after stimulation with ConA (2.5 $\mu\text{g/ml}$) and ConBr (10 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h, 48 h, 72 h, and 6 days. Culture media were carefully collected for subsequent analysis using the colorimetric Griess method (Ding et al., 1988). NO concentration was estimated using a standard curve (3.12–100 $\mu\text{mol/ml}$).

Statistical analysis

All data were analysed using non-parametric tests. To detect differences among groups, the Mann–Whitney U test was used. All results were expressed using mean values \pm standard deviation (S.D.) and were considered statistically significant when the p value was <0.05 .

Results and Discussion

Plant lectins are a group of proteins and glycoproteins with potent biological activities. The anticancer properties of lectins have been demonstrated *in vitro*, *in vivo* and in human case studies, suggesting their role as therapeutic agents. Lectin molecules are known to bind to cancer cell membranes or receptors thereby, causing cytotoxicity, apoptosis and inhibition of tumor growth (de Mejía and Prisecaru, 2005).

It was found that ConBr induced B16F10 cell death in a dose-dependent manner. ConBr at 200 $\mu\text{g/ml}$ exerted a potent inhibitory effect on the growth of B16F10 cells. After B16F10 cells were incubated with 25 $\mu\text{g/ml}$ for 24h, the inhibitory ratio reached nearly 50%. Thus, 24 h incubation with 25 $\mu\text{g/ml}$ is sufficient for 50% reduction of cell growth (IC₅₀) (Figure 1).

Apoptosis plays an important role in the regulation of cell number during development and tissue homeostasis. The dysregulation of apoptosis resulting in increased or decreased activity is associated with a variety of clinical disorders including cancer, autoimmunity, neurodegenerative diseases, hematopoietic disorders and infertility. Cancer chemotherapy utilizes apoptosis to eliminate tumor cells (Kiechle e Zhang, 2002).

In order to distinguish between intact, early apoptosis or late apoptosis of cells, the cells were stained simultaneously with Annexin V and PI (Vermes et al. 1995). To quantify ConBr-induced apoptosis, B16F10 cells were stained with Annexin V/FITC and PI and were subjected to flow cytometry. In control culture, 18.57% cells were in early apoptosis whereas 8.5% cells were in late apoptosis stage. After the cells were treated with ConBr (100 µg/ml) for 24 h, the percentages of apoptotic cells at early phase increased to 16% and that of late phase increased to 71.5%. Whereas, when the cells treated with ConBr (100 µg/ml) for 48 h, 9% cells were in the early apoptosis, and 84% cells were in late apoptosis. These results clearly indicate that ConBr evoked apoptosis in melanoma murine B16F10 cells (Figure 2).

The remarkable antineoplastic activity of plant lectins has driven much attention to cancer studies (Jung et al., 2007). Research shows that suppression of apoptosis is critical for tumour maintenance (Hickman, 2002). A great number of studies have reported that some 'ideal' anti-cancer candidate drugs can induce apoptosis in susceptible cancer cells (Nicholson, 2000). Like these anti-cancer drugs, ConBr executed dose-dependent growth inhibitory effect on murine B16F10 cancer cells. It is axiomatic that cancer therapies can work in two different ways, by induction of apoptosis as well as by direct cytotoxicity (Cheng et al., 2008).

The major break through in plant lectin research has been achieved with many legume lectins in the study of antineoplastic activity (Orntoft and Vestergaard, 1999). ConA, the firstly reported legume lectin, is cytotoxic or strongly inhibitory to some tumor cells, which has been found to be mediated by autophagy through mitochondrial pathway. Nevertheless, the typical caspase-dependent apoptosis was not observed (Chang et al., 2007).

Liu et al., (2009) reported the mannose-binding activity of ConA had a significant influence on the antiproliferative activity on human melanoma A375 cells. Authors indicated that ConA induced human melanoma A375 apoptosis in a caspase-dependent manner and also demonstrated that ConA induced human melanoma A375 cell death through a mitochondrial apoptotic pathway.

The effect of rice bran agglutinin (RBA) on U937 cells was examined in comparison with those of wheat germ agglutinin (WGA) and *Viscum album* agglutinin (VAA). These lectins inhibit cell growth, and several cell lines of evidence indicate that the growth inhibition is caused by the induction of apoptosis (Miyoshi et al., 2001). WGA is able to induce apoptosis of various tumor cells after a very short time (30min) of incubation (Gastman et al., 2004).

Figure 3 shows the migration assay of murine melanoma B16F10 cells when cultured with different concentrations of ConBr. We could observe that inhibition of cell migration occurred in a dose dependent manner. Concentrations under 10 µg/ml didn't present inhibitory effect on migration of murine melanoma B16F10 cells.

NO synthesis is part of the inflammatory response against pathogens, such as bacteria, viruses, and tumor cells. Under conditions of massive NO formation the various regulatory, cytostatic, and/or toxic consequences of NO may play important roles in the pathophysiology of tissue or cell destruction. Toxic consequences as a result of NO generation seem predictable. However, during infection and inflammation NO generation appears to act both as a direct apoptotic inducer and as a regulator of other effectors. Therefore, the role of NO during apoptosis is ambivalent and NO may function both, as an activator and inhibitor of the death program, depending on the biological milieu, i.e., the presence or absence of stimulatory or inhibitory cosignals (Brune et al., 1998).

Glycosylation of proteins and lipids is an intricately regulated process, which results in a fingerprint-like profile of carbohydrate epitopes at the cell surface (Kopitz, 2009). Initially exploited as phenotypic cell markers (Danguy et al., 1994), increasing evidence supports the concept for a pivotal functionality encoded in distinct aspects of the glycomic profile, especially the spatially accessible branch-end structures including sialylation, the branching pattern and the core substitutions of N-glycans (André et al., 2009). According to Wouwer and colleagues (2011), NO affects the O-GlcNAcylation of several cellular proteins, enhanced O-GlcNAcylation mostly concerns a set of at least three proteins with apparent molecular masses of 150, 115 and 90 kDa.

Although only the ConBr concentrations of 25 µg/ml and 50 µg/ml were statistically significant compared to control group (Figure 4), the concentration of NO produced by the treated cells at concentrations between 2.5 µg/ml – 5 µg/ml, have been sufficient to change the glycosylation pattern of the cells, thus reducing the affinity of ConBr for carbohydrates on cell surface.

IL-12 cytokine induced by ConBr on murine melanoma B16F10 cells after incubation time of 48 h showed statistically significant levels for used concentrations. It was noticed that it did not occur in a dose-dependent manner (Figure 5).

IL-12 cytokine has the ability to stimulate natural killer cells (NK) cells (Perusia et al., 1992) and induce production of cytokines such as IFN- γ by T lymphocytes and NK cells (Chan et al., 1991). Dabrowasha and colleagues (2000) demonstrated the anti-angiogenic effect of IL-12 B16F10 melanoma cells when used with an inhibitor of metalloproteinases (BB-94). IL-12 stimulated production of IFN- γ , which in combination with BB-94 has a greater antitumor effect. Lasek and colleagues (1997) and Coughlin

and colleagues (1998) demonstrated that tumour cells express IL-12 have antiangiogenic action by the induction of IFN- γ .

Preliminary results of this study suggest that ConBr may be a potential antitumour agent for B16F10 cells. Further studies must be performed in order to know possible effects of lectins in this type of tumour as well as to understand how ConBr can affect *in vivo* this type of cancer.

References

Andrade JL, Arruda S, Barbosa T, Paim L, Ramos MV, Cavada BS, Barral-Netto M (1999) Lectin-induced nitric oxide production. *Cell Immunol.* 194:98-102

André S, Kozár T, Kojima S, Unverzagt C, Gabius HJ (2009) From structural to functional glycomics: core substitutions as molecular switches for shape and lectin affinity of N-glycans. *Biol. Chem.* 390:557–565

Barbosa T, Arruda S, Cavada B, Grangeiro TB, de Freitas LA, Barral-Netto M (2001) *In vivo* lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96:673-678

Barral-Netto M, Santos SB, Barral A, Moreira LI, Santos CF, Moreira RA, Oliveira JT, Cavada BS (1992) Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleae tribe. *Immunol Invest* 21:297-303

Brüne B, von Knethen A, Sandau KB (1998) Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol* 351:26-72

Cavada BS, Barbosa T, Arruda S, Grangeiro TB, Barral-Netto M (2001) Revisiting proteus: do minor change in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins, *Curr. Protein Pept. Sci.* 2:123–135

Calvete JJ, Thole HH, Raida M, Urbanke C, Romero A, Grangeiro TB, Ramos MV, Almeida da Rocha IM, Guimaraes FN, Cavada BS (1999) Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins, *Biochim. Biophys. Acta* 1430:367–375

Chan SH, Perussia B, Gupta JW, Kobayashi M, Pospisil M, Young HA, Wolf SF, Young D, Clark SC, Trinchieri G (1991) Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J Exp Med* 173:869-879

Chang CP, Yang MC, Liu HS, Lin YS, Lei HY (2007) Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model. *Hepatology* 45:286-296

Chen J, Liu B, Ji N, Zhou J, Bian HJ, Li CY, Chen F, Bao JK (2009) A novel sialic acid-specific lectin from *Phaseolus coccineus* seeds with potent antineoplastic and antifungal activities. *Phytomedicine* 16:352–360

Cheng Y, Qiu F, Huang J, Tashiro Si, Onodera S, Ikejima T (2008) Apoptosis-suppressing and autophagy-promoting effects of Calpain on Oridonin-induced L929 cell death. *Arch. Biochem. Biophys.* 475:148-155

Cheng Y, Qiu F, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T (2008) ERK and JNK mediate TNF alpha induced p53 activation in apoptotic and autophagic L929 cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 376:483–488

Coughlin CM, Salhany KE, Wysocka M, Aruga E, Kurzawa H, Chang AE, Hunter CA, Fox JC, Trinchieri G, Lee WM (1998) Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis. *J Clin Invest.* 101:441-52

Danguy A, Akif F, Pajak B, Gabius HJ. (1994) Contribution of carbohydrate histochemistry to glycobiology, *Histol. Histopathol.* 9:155–171

Dabrowska A, Giermasz A, Marczak M, Golab J, Jakobisiak M (2000) Potentiated antitumoral effects of interleukin 12 and matrix metalloproteinase inhibitor batimastat against B16F10 melanoma in mice. *Anticancer Res* 20:391-394

de Mejía EG, Prisecaru VI (2005) Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45:425–445

Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 141:2407-2412

Gastman B, Wang K, Han J, Zhu ZY, Huang XJ, Wang GQ, Rabinowich H, Gorelik E (2004) A novel apoptotic pathway as defined by lectin cellular initiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316: 263–271

Hickman JA (2002) Apoptosis and tumorigenesis John A Hickman *Curr Opin Genet Dev* 12:67–72

Jordinson M, El-Hariry I, Calnan D, Calam J, Pignatelli M (1999) *Vicia faba* agglutinin, the lectin present in broad beans, stimulates differentiation of undifferentiated colon cancer cells. *Gut* 44:709–714

Jung EC, Kim KD, Bae CH, Kim JC, Kim DK, Kim HH (2007) A mushroom lectin from ascomycete *Cordyceps militaris*. *Biochim Biophys Acta* 1770:833–8

Kiechle FL, Zhang X (2002) Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clin Chim Acta* 326:27-45

Kopitz J, (2009) Glycolipids, in: Gabius HJ (Ed.), *The Sugar Code. Fundamentals of Glycosciences*, Wiley-VCH, Weinheim, pp 177–198

Lasek W, Feleszko W, Golab J, Stokłosa T, Marczak M, Dabrowska A, Malejczyk M, Jakóbisiak M (1997) Antitumor effects of the combination immunotherapy with interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha in mice. *Cancer Immunol Immunother* 45:100-108

Liu B, Li CY, Bian HJ, Min MW, Chen LF, Bao JK (2009) Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 482:1–6

Liu B, Xu XC, Cheng Y, Huang J, Liu YH, Liu Z, Min MW, Bian HJ, Chen J, Bao JK 2008 Apoptosis-inducing effect and structural basis of *Polygonatum cyrtoneuma* lectin and chemical modification properties on its mannose-binding sites. *BMB Rep* 41:369-75

Lopes FC, Cavada BS, Pinto VP, Sampaio AH, Gomes JC (2005) Differential effect of plant lectins on mast cells of different origins. *Braz J Med Biol Res* 38:935-941

Miyoshi N, Koyama Y, Katsuno Y, Hayakawa S, Mita T, Ohta T, Kaji K, Isemura M (2001) Apoptosis induction associated with cell cycle dysregulation by rice bran agglutinin. *J. Biochem. (Tokyo)* 130:799–805

Moreira RA, Cavada BS (1984) Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation, characterization and behavior during germination. *Biologia Plantarum* 26:113-120

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63

Nicholson DW (2000) From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 407:810–816

Orntoft TF, Vestergaard EM (1999) Clinical aspects of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Electrophoresis* 20:362–371.

Perussia B, Chan SH, D'Andrea A, Tsuji K, Santoli D, Pospisil M, Young D, Wolf SF, Trinchieri G (1992) Natural killer (NK) cell stimulatory factor or IL-12 has differential effects on proliferation of TCR-alpha beta+, TCR-gamma delta+ T lymphocytes, and NK cells. *J Immunol* 149:3495-502

Reed JC (2003) Apoptosis-targeted therapies for cancer. *Cancer Cell* 3:17–22. Sanz-Aparicio J, Hermoso J, Grangeiro TB, Calvete JJ, Cavada BS (1997) The crystal

structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. *FEBS Lett* 405:114-8

Sharon N (2007) Carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. *J. Biol. Chem.* 282:2753–2764

Silva FO, Santos PN, Melo CML, Teixeira EH, Cavada BS, Arruda FV, Cajazeiras JB, Almeida AC, Pereira VRA, Porto ALF (2011) Immunostimulatory activity of ConBr: a focus on splenocyte proliferation and proliferative cytokine secretion. *Cell and Tissue Res* 346:237-244

Van de Wouwer M, André S, Gabius HJ, Villalobo A. (2011) Nitric oxide changes distinct aspects of the glycophenotype of human neuroblastoma NB69 cells. *Nitric Oxide* 24:91-101

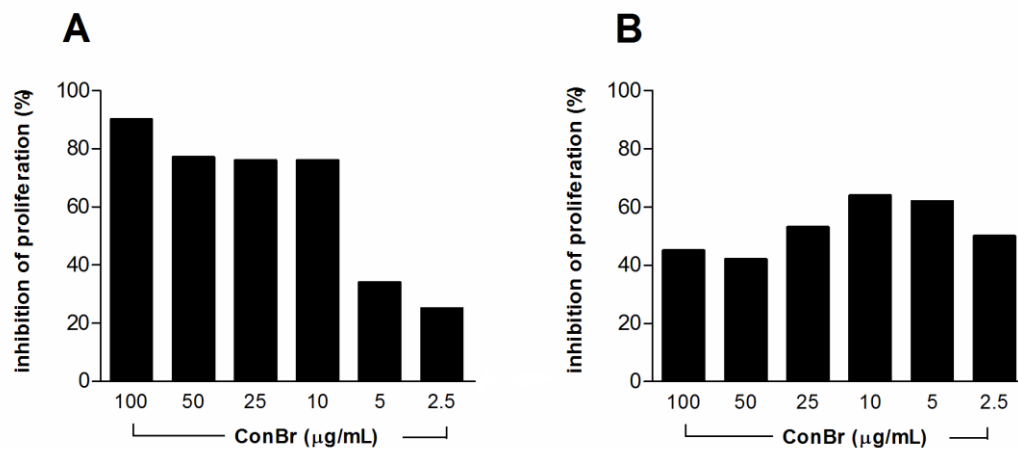


Fig 1 Effect of ConBr on the proliferation of murine melanoma B16F10 cells. Inhibition of proliferation was calculated according to materials and methods with data obtained from quadruplicate experiments. Cells (3×10^5) were treated with different ConBr concentrations at 24 h (A) and 48 h (B).

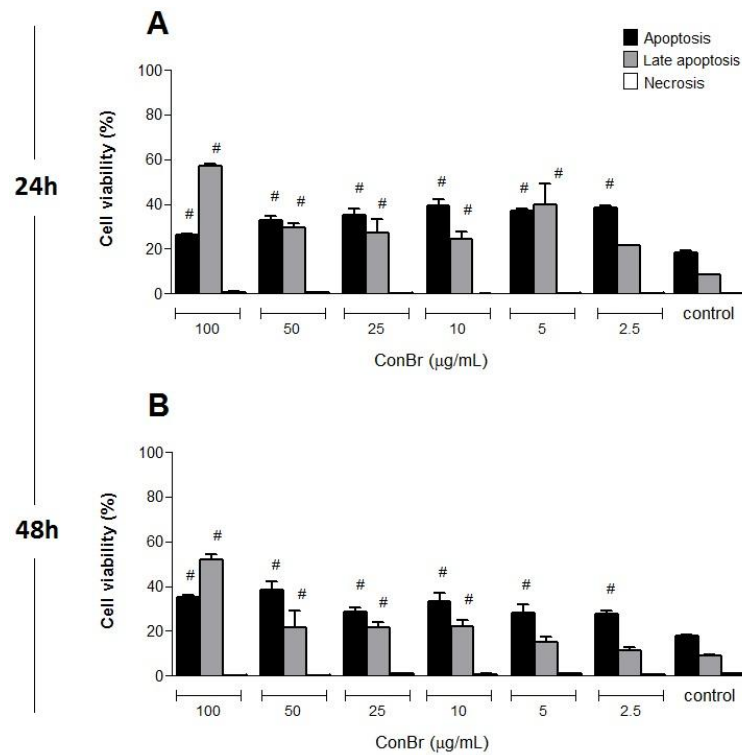


Fig. 2 The apoptotic ConBr effect on murine melanoma B16F10 cells at 24 h (A) and 48 h (B). Murine melanoma B16F10 cells (5×10^5 cells/ml) were treated with different ConBr concentrations. Induction of B16F10 cell death was characterized by apoptosis. ConBr A induced increased apoptosis and late apoptosis as compared to the control.

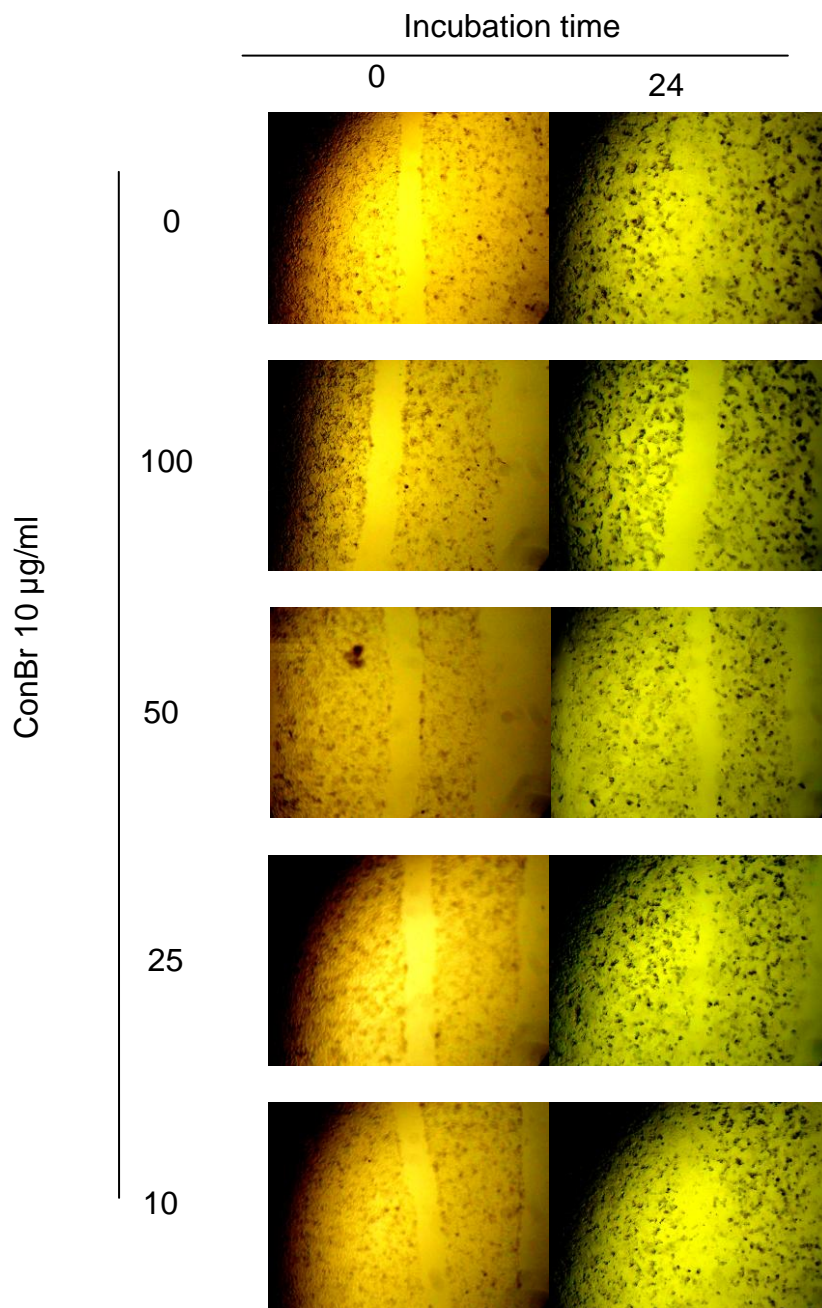


Fig 3 Effects of ConBr on cell migration in B16-F10 cells. B16-F10 cells (10^6) were treated with ConBr (0, 10, 25, 50, and 100 µg/ml) for 24 h. Cell migration was determined by cell migration assay. The plates were photographed at 0 and 24 h post-wounding, and were determined by quantifying the relative proportion wounded at time zero.

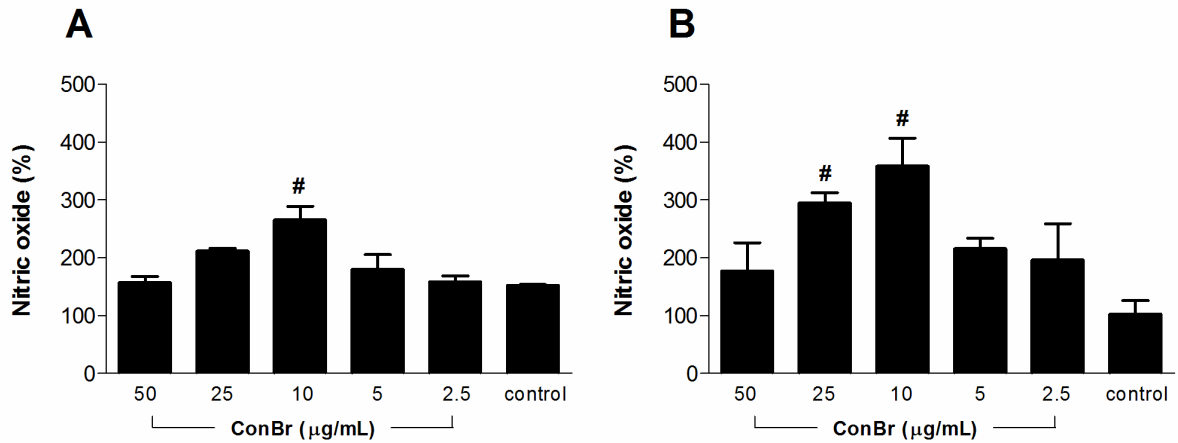


Fig. 4 NO production in murine melanoma B16F10 cells with ConBr. Cells (5×10^5 cells/ml) were stimulated by ConBr (2.5, 5.0, 10, 25, and 50 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h and 48 h (A and B respectively). Non-stimulated cells were used as negative controls. Supernatants were collected, and the nitrite (NO) concentration from the supernatants was determined using the Griess reagent as described in the Materials and Methods. Data represent the means \pm SD of two independent observations performed in triplicate. Differences were considered significant at $p < 0.05$ as compared to the ConA positive control and negative control groups.

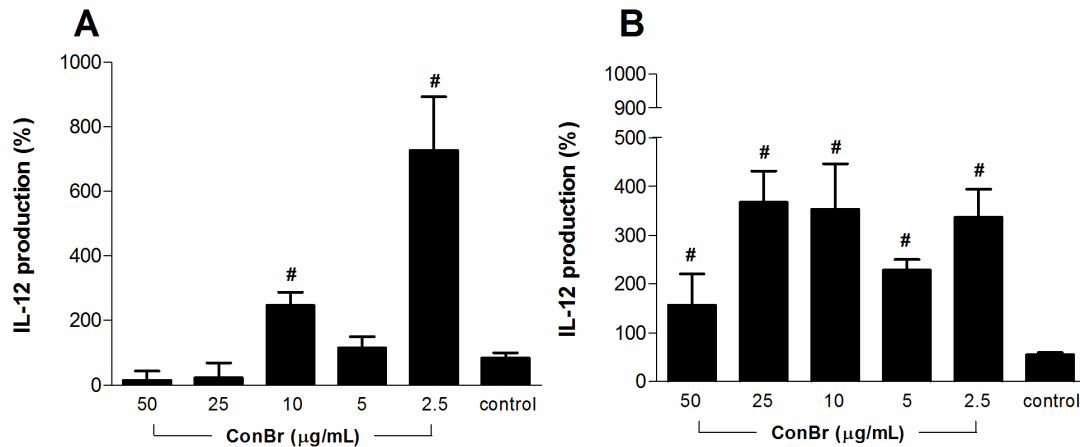


Fig 5 IL-12 production in murine melanoma B16F10 cells with ConBr. Cells (5×10^5 cells/ml) were stimulated by ConBr (2.5, 5.0, 10, 25, and 50 µg/ml) for 24 h and 48 h (A and B respectively). Non-stimulated cells were used as negative controls. Supernatants were collected, and the IL-12 concentration from the supernatants was determined using an enzyme-linked immunosorbent assay from Kit OptEIA (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Data represent the means \pm SD of two independent observations performed in triplicate. Differences were considered significant at $p < 0.05$ as compared to the ConA positive control and negative control groups.

6. CONCLUSÓES

Verificou-se neste estudo que a lectina ConBr induziu a proliferação de esplenócitos murinos promovendo a produção de citocinas e óxido nítrico, além de apresentar um efeito anti proliferativo frente a células B16F10 de melanoma murino.

Estudos futuros deverão ser realizados a fim de se estudar o envolvimento do sítio ligador de carboidrato nas respostas observadas, além disso, pesquisas demonstram que algumas lectinas apresentam atividade biológica mesmo após sofrer desnaturação, indicando a existência de outros sítios ligadores na molécula, outro aspecto interessante e que também pode ser investigado em pesquisas futuras.

7. ANEXOS

Instructions for Authors

Cell and Tissue Research

General

Cell & Tissue Research publishes reports on novel results in any area of experimental biology. The work should be of high significance within its field, but also of interest to researchers outside the immediate area. Papers should be as concise as possible.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer now provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink. We regret that Springer Open Choice cannot be ordered for published articles. Open Choice does not apply to Society Journals.

Editorial procedure

Paper submissions will no longer be accepted. Authors are requested to submit papers in English online in order to facilitate quick and efficient processing. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times.

To submit your manuscript log directly onto the site at the following link and upload your manuscript following the onscreen instructions

<http://mc.manuscriptcentral.com/ctr>

Co-authors should note that they have the responsibility to read and edit manuscripts bearing their name.

For further information contact the Editorial Office: ctr@springer.com

Organization and General Style of Research Articles

Articles need to be efficient and concise. Authors are requested to submit a cover letter explaining the significance of the work and its contribution to the field.

Abstract:

A single paragraph of fewer than 250 words.

Keywords:

Up to five.

Introduction:

Succinct, no subheadings.

Materials and methods:

Should follow the Introduction and should provide enough information to permit repetition of the experimental work.

Results and Discussion:

May each be divided by subheadings. Symbols and names for genetic loci, alleles, DNA and RNA should be italicized. Nonstandard abbreviations should be defined when first used in the text. All text should be double spaced.

References:

Include only articles that have been published or are in press. Personal communications should be documented by a letter of permission.

Please use the following style:

Bornstein JC, Furness JB, Smith TK, Trussell DC (1991) Synaptic responses evoked by mechanical stimulation of the mucosa in morphologically characterized myenteric neurons of the guinea pig ileum. *J Neurosci* 11:505–518

Furness JB, Costa M (1987) *The enteric nervous system*. Churchill Livingstone, Edinburgh
 Unsicker K, Suter-Crazzolara C, Kriegstein K (1999) Neurotrophic roles of GDNF and related factors. In: Hefti F (ed) *Handbook of experimental pharmacology*, vol 134. Neurotrophic factors. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 189–224

Artwork Guidelines

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork. For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS office files are not acceptable. Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files. Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Line drawings should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

Definition: Photographs or paintings with fine shading.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves (without lettering).

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftone plus line drawing, halftone with extensive lettering, color diagrams.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color illustrations if meaningful are free of charge.

Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

To add lettering, we request to use Arial.

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 12 - 16 pt.

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions into your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures must always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts must be denoted by lowercase roman letters (a, b, c, etc.) Type Arial, size 12-16 pt. Please use always letters of the same size for the principal lettering inside your figures.

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc."

Figure Captions

Each figure should have a caption describing accurately what the figure depicts.

Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption. Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Authors must prepare their illustrations to match following sizes:

- 1 subcolumn width (3.9 cm)
- 1 column width (8.4 cm)
- 1.5 column width (12.9 cm)

- the whole page width (17.4 cm)
- length can vary, but must not exceed 23.4 cm

When submitting a panel, all parts should be arranged as one figure and saved in a single file. Panels should not be boxed in by borderlines. The vertical and horizontal space between the individual parts of a figure should be consistently 1 mm.

Cover figures

Cover figures are chosen by the Coordinating Editor. Suggestions for cover illustrations are welcome (the author must own copyright to the image). The image must be sharp enough to allow magnification to the size of 13 cm (length) x 18 cm (width).

Publication Schedule

We try to let authors have the reviewers' comments in less than a month. After acceptance, articles will be published electronically within approximately 6 weeks on the net (<http://www.springerlink.com>) and in the journal in less than three months.

One complimentary copy is supplied. Orders for offprints can be placed by returning the order form with the corrected proofs.

Paper types

Reviews (up to 20 printed pages including illustrations) and Minireviews (no more than 5 printed pages, line drawings only) should address issues relevant to a wide readership and intelligible to non-specialists. Minireviews must focus on topics of recent experimental research. Proposals for reviews/ minireviews should be submitted to the Coordinating Editor.

At-a-glance articles are a new format in Cell & Tissue Research and highlight a topic of high general interest. Typically, an At-a-glance article is 2 printed pages in length (8500 characters), with 2 figures and approx. 15 literature references. It does not have abstract or keywords.

Brief accounts containing new and interesting results may be published as Short communications (up to 4 printed pages, including figures and tables).

Electronic Supplementary Material

Authors are free to submit supplementary material and, if the manuscript is accepted for publication, such material will be published online at the publisher's website, linked to the article.

All supplementary material can be submitted in standard file formats including in each file the following information: article title, journal name, author names. To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Submission formats:

- for text and presentations submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability
- a collection of figures may also be combined in a PDF file
- spreadsheets should be converted to PDF

If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables. For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file. Name the files consecutively, e.g. "Figure S1", "Figure S2", "Table S1", "Table S2" and refer to the supplementary files as "Electronic Supplementary Material", e.g. "s. Electronic Supplementary Material, Fig. S1".

Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Homepage

For more information concerning submissions to Cell & Tissue Research consult

<http://springer.com>

<http://www.springer.com/journal/441>