



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

TALITA ABRANTE LEITE

**CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DA FRUTALINA RECOMBINANTE E SUA
APLICAÇÃO NA PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS A1 (SIgA1)
SECRETORAS HUMANAS.**

FORTALEZA

2016

TALITA ABRANTE LEITE

CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DA FRUTALINA RECOMBINANTE E SUA
APLICAÇÃO NA PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS A1 (SIgA1)
SECRETORAS HUMANAS”.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.
Área de concentração: Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha

Co-orientador: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L558c Leite, Talita.
Caracterização biofísica da frutalina recombinante e sua aplicação na purificação de imunoglobulinas A1 (SIgA1) secretoras humanas / Talita Leite. – 2016.
83 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha.
Coorientação: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva.
1. Frutalina recombinante. 2. Imobilização de lectina. 3. SIgA1. 4. Artocarpus incisa. I.
Título.

CDD 572

TALITA ABRANTE LEITE

CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DA FRUTALINA RECOMBINANTE E SUA
APLICAÇÃO NA PURIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS A1 (SIgA1)
SECRETORAS HUMANAS”.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial para
obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.
Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em ____/____/____

Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha (Orientador)
Universidade Federal do Ceará- UFC

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Plínio de La Torre
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

A Deus.

Aos meus pais Cleide e Orlando

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha, por ter me acolhido nessa jornada que foi o mestrado.

Ao meu co-orientador, meu pai científico, Professor Dr. André Luis Coelho da Silva, pelos ensinamentos, paciência e disponibilidade durante a orientação. Por todos os incentivos e críticas, que levo como aprendizado para minha vida.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, que foram parte importante da nossa formação.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Hermógenes David de Oliveira e Prof. Dr. Plínio De La Torre, por aceitarem contribuir com o aperfeiçoamento desse trabalho, dedicando seu tempo e conhecimento.

Aos meus amigos do Laboratório de Biotecnologia Molecular (LabBMol) e do Laboratório de Biocristalografia (LaBiC): Samara, Vinícius, Mário, Rejane, Tanimana, Ana Beatriz, Igor, Wallady, Danilo, Germana e João Pedro, por toda a parceria, aprendizados, ajudas e momentos de descontração.

À minha amiga Vanessa de Abreu, por toda a parceria e ajuda dedicada durante minha jornada científica

Aos meus pais, Cleide e Orlando, que dedicaram todo seu tempo, amor, atenção e conselhos, me incentivando e me dando apoio.

Ao Anderson, por todo carinho, toda dedicação e toda ajuda, sendo a pessoa que mais me incentivou e acreditou no meu sucesso.

À Universidade Federal do Ceará, pela estrutura concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro.

“O que passou, passou, mas o que passou
luzindo, resplandecerá para sempre ”

Johann Goethe.

RESUMO

A frutalina é uma multilectina capaz de se ligar a α -D-galactose e α -D-manose, presente em sementes de fruta-pão de caroço (*Artocarpus incisa* L.). Ela pertence a família das “lectinas relacionadas a jacalina” e apresenta em torno de 98% de identidade com a jacalina. Em decorrência da alta identidade estrutural entre a jacalina e a frutalina e a utilização da jacalina na purificação de IgA₁, estudos recentes mostram a utilização da frutalina imobilizada para a purificação de IgA₁ humano o que a torna uma alternativa de baixo custo á matriz comercial *ImmobilizedJacalin*®. Um dos problemas inerentes a utilização da frutalina imobilizada como alternativa na purificação de IgA₁ humano é a quantidade de material biológico necessário para a construção das matrizes cromatográficas. Uma alternativa é a utilização da proteína produzida heterologicamente em microorganismos. Neste trabalho objetivou-se a caracterização biofísica da frutalina recombinante (rFrutalin) e a avaliação da sua utilização como insumo na purificação de IgA₁ de colostro humano. A rFrutalina foi expressa em cepas de *Pichia pastoris* KM71H transformadas e a sua purificação feita em coluna de agarose-D-Galactose (Sigma). Para a caracterização biofísica foram feitas análises de dicróismo circular (CD) para avaliação da termoestabilidade, influencia da variação de pH e predição das estruturas secundárias, além de análises de fluorimetria intrínseca, espalhamento dinâmico da luz (DLS) e espalhamento de luz eletroforético (ELS ou Potencial Zeta). Para a produção de uma matriz de purificação de IgA₁ do colostro humano, foram testadas amostras da rFrutalina (na concentração de 4 mg/mL de matriz) no processo de imobilização na agarose ativada. Em seguida, essas amostras foram adicionadas às matrizes ativadas e mantidas sob agitação a 4 °C por 2 minutos. Foram avaliados diferentes tempos de imobilização (2, 6 e 12 horas). Os resultados de CD da rFrutalina apresentaram um perfil similar ao da frutalina nativa, mostrando predominância de estruturas do tipo folhas- β . A rFrutalina apresenta conformação estável em condições ácidas e em temperaturas de até 60°C. O método de espalhamento dinâmico de luz (DLS) confirmou que a oligomerização da rFrutalina não muda com a variação de pH e que sua massa corresponde, aproximadamente, a 59 ± 4 kDa. As matrizes agarose-rFrutalina produzidas foram capazes de reter uma fração rica em IgA₁ (Fr_{IgA1}). Todas as

matrizes testadas apresentaram dois picos cromatográficos: um pico referente as proteínas que não interagiram com a matriz e outro pico, referente a Fr_{IgA1} que interagiu com a matriz e foi eluída com D-galactose. Com base nesse resultado, ficou evidente que o tempo de imobilização da rFrutalina na matriz, influenciou proporcionalmente na sua capacidade de retenção do ligante, já que a matriz submetida a imobilização por 12 h apresentou um melhor desempenho cromatográfico. Do ponto de vista biofísico, a rFrutalina expressa em *P. pastoris*, não apresentou nenhuma mudança significativa, quando relacionada as características biofísicas da frutalina nativa, o que corrobora a utilização da rFrutalina na purificação de IgA1 de colostro humano, como uma alternativa viável a matriz comercial *ImmobilizedJacalin*®.

Palavras-chave: Frutalina recombinante. Imobilização de lectina. SIgA1. *Artocarpus incisa*.

ABSTRACT

Frutalin is a α -D-galactose and α -D-mannose binding multilectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. It belongs to the 'jacalin lectins related' family and presents around 98% identity with jacalina. Due to the high structural identity between jacalin and frutalin and the use of jacalin for IgA1 purification, a recent study showed the use of immobilized frutalin for human IgA1 purification. A low-cost alternative to the commercial *ImmobilizedJacalin*[®] column. One of the problems inherent in the use of immobilized frutalin as an alternative to human IgA1 purification is the amount of biological material necessary for the construction of chromatographic matrices. An alternative is the use of protein heterologously produced in microorganisms. This work aimed to biophysical characterization of recombinant frutalin (rFrutalin) and evaluation of its use as input in IgA1 purification of human colostrum. Frutalin was expressed in *Pichia pastoris* KM71H strain transformed and purified in agarose-D-galactose columns (Sigma). For biophysical characterization circular dichroism (CD) analysis was performed to evaluate the thermal stability, influences of pH variation and prediction of secondary structures, and intrinsic fluorimetric analysis, dynamic light scattering (DLS) and scattering electrophoretic light (ELS or Zeta Potential). For the production of an IgA1 purification matrix of human colostrum, samples were tested in the rFrutalin (at concentration of 4 mg / ml matrix) in the locking process in the activated agarose. Then the samples were added to the activated matrices and maintained under stirring at 4 ° C for 2 minutes. Immobilization was evaluated at different times (2, 6 and 12 hours). The rFrutalin CD results showed a negative band with a maximum amplitude 218 and another positive band with a maximum 222 nm profile, similar to the native frutalin, showing predominantly sheet- β structure. Frutalin is stable, conformationally under acidic conditions at temperatures up to 60 ° C. The dynamic light scattering method (DLS) confirmed that the oligomerization of rFrutalin does not change with pH change and that its mass corresponds to approximately 59 ± 4 kDa. The agarose-frutalin matrices produced were able to retain a rich fraction IgA1 (FrIgA1). All tested matrices showed two chromatographic peaks: a peak related to proteins which did not interact with the matrix and another peak related to FrIgA1 that interacted with the matrix and was eluted with D-galactose. Based on this result, it became clear that the downtime of the rFrutalin matrix influenced proportionally in its binder holding capacity, since the matrix

subjected to immobilization for 12 h showed better chromatographic performance. By the biophysical point of view, rFrutalina expressed in *P. pastoris*, showed no significant change when related to biophysical characteristics of the native frutalin, which supports the use of rFrutalina in IgA1 purification of human colostrum, as a viable alternative to commercial *ImmobilizedJacalin*® column.

Keywords: Recombinant frutalin. Lectin immobilized. SIgA1. *Artocarpus incisa*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	–	Classificação estrutural das lectinas vegetais.....	18
Figura 2	–	Classificação das Lectinas Vegetais.....	20
Figura 3	–	Estrutura tridimensional de lectinas do genero Artocarpus..	26
Figura 4	–	Representação esquemática das três isoformas de IgA.....	30
Figura 5	–	Purificação da frutalina nativa e análise eletroforética.....	48
Figura 6	–	Purificação da rFrutalina e análise eletroforética.....	49
Figura 7	–	Ensaio de atividade hemaglutinante da rFrutalina utilizando hemácias normais de coelho.....	50
Figura 8	–	Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (12,5%) rFrutalina.....	50
Figura 9	–	Purificação do anticorpo policlonal anti-frutalina por cromatografia de afinidade em Sepharose-Proteína A.....	52
Figura 10	–	Imunodeteção da frutalina e da rFrutalina utilizando o anticorpo anti-frutalina produzido no LabBMol.....	52
Figura 11	–	Espectros de dicroísmo circular da frutalina nativa e da rFrutalina.....	53
Figura 12	–	Espectros de dicroísmo circular da rFrutalina em diferentes valores de pH.....	55
Figura 13	–	Curva de termoestabilidade da estrutura secundária obtida dos espectros de dicroísmo circular da rFrutalina.....	57
Figura 14	–	Espectro de emissão de fluorescência da rFrutalina em diferentes valores de pH.....	60
Figura 15	–	Espectro de emissão de fluorescência da rFrutalina na presença de D-galactose.....	61
Figura 16	–	Caracterização da rFrutalina por espalhamento dinâmico de luz (DLS) em função do pH.....	62
Figura 17	–	Potencial zeta da rFrutalina em função.....	63
Figura 18	–	Purificação da IgA ₁ de colostro humano por cromatografia de afinidade em colunas de agarose-rFrutalina e <i>Immobilized Jacalin</i> ®.....	64

Figura 19 –	Análise eletroforética das frações ricas em IgA1 (Fr_{IgA1}) retidas nas matrizes de agarose-rFrutalina e <i>Immobilized Jacalin®</i>	65
Tabela 1-	Predição da estrutura secundária da rFutalina utilizando os programas <i>CONTIN</i> e <i>SELCON 3</i>	55

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Considerações gerais sobre as lectinas.....	16
1.2	Atividades e potencial biotecnológico das lectinas vegetais.....	21
1.3	Lectinas de espécies do gênero <i>Artocarpus</i>	24
1.4	Frutalina recombinante.....	27
1.5	Imunoglobulina a (IgA).....	29
2	OBJETIVOS	33
2.1	Gerais.....	33
2.2	Específicos.....	33
3	MATERIAIS	34
3.1	Vegetal.....	34
3.2	Animal.....	34
3.3	Fungo.....	34
3.4	Colostro humano.....	34
3.5	Reagentes.....	35
4	METODOS	36
4.1	Preparação da farinha das sementes de <i>Artocarpus incisa</i>	36
4.2	Obtenção do extrato total da farinha de sementes de <i>A. incisa</i>	36
4.3	Purificação da frutalina nativa.....	36
4.4	Produção de anticorpos policlonais anti-frutalina.....	37
4.5	Expressão da frutalina recombinante em <i>P. pastoris</i>	37
4.6	Purificação da frutalina recombinante (rFrutalina).....	38
4.7	Dosagem de proteínas solúveis.....	38
4.8	Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)..	38
4.9	Determinação da atividade hemaglutinante.....	39

4.10	<i>Western blot</i>	39
4.11	Eletoforese bidimensional (2D).....	40
4.12	Caracterização biofísica da rFrutalina.....	41
4.12.1	<i>Dicroísmo circular e predição da estrutura secundária</i>	41
4.12.2	<i>Efeito da variação de pH na estabilidade conformacional da rFrutalina</i>	41
4.12.3	<i>Termoestabilidade da rFrutalina</i>	41
4.12.4	<i>Fluorescência intrínseca da rFrutalina</i>	42
4.12.5	<i>Efeito do pH sobre a fluorescência intrínseca da rFrutalina</i>	42
4.12.6	<i>Efeito do açúcar ligante sobre a fluorescência intrínseca da rFrutalina</i>	42
4.12.7	<i>Espalhamento dinâmico da lu da rFrutalina</i>	43
4.12.8	<i>Potencial zeta da rFrutalina</i>	43
4.13	Imobilização da rFrutalina em agarose-CNBr ativada.....	43
4.14	Processamento do colostro humano.....	44
4.15	Determinação da IgA total.....	45
4.16	Precipitação de proteínas do colostro.....	45
4.17	Purificação de IgA1 de colostro humano utilizando matrizes de agarose imobilizadas com a rFrutalina.....	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
6	CONCLUSÃO	66
	REFERENCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais sobre as Lectinas

Os carboidratos, devido ao seu enorme potencial codificador agem como intermediários na comunicação celular. Cada um dos monossacarídeos constituintes de um determinado oligossacarídeo presente em uma célula, representa potencialmente uma palavra no “glicocódigo”, que pode ser lida pelas proteínas capazes de interagir com esses carboidratos (GABIUS *et al.*, 2002). As informações contidas nas estruturas de oligossacarídeos conjugados a proteínas ou lipídios na superfície das células são reconhecidas por um grupo especializado de proteínas, as lectinas (SANZAPARICIO *et al.*, 1997; BREWER *et al.*, 2002).

As Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica, ubiquamente distribuídas na natureza, as quais reconhecem e ligam-se reversivelmente a carboidratos (LAM, 2001).

Stillmark, em 1888, foi o primeiro a relatar um composto com atividade hemaglutinante, descrito como um fator tóxico extraído das sementes de *Ricinus communis L* (mamona), com a capacidade de aglutinar células vermelhas. Ele atribuiu tanto a toxicidade quanto a atividade aglutinante a esse composto, que foi nomeado ricina. Hellín (1891) também demonstrou a presença de uma proteína hemaglutinante no extrato protéico de feijão Jeriquity (*Abrus precatorius*), a abrina, sendo ambas empregadas como modelos antigênicos para estudos imunológicos (apud SHARON & LIS, 2004). A primeira lectina isolada foi a concanavalina A (ConA) (SUMMER, 1919), extraída de sementes de *Canavalia ensiformis*, também conhecidos como Jackbean ou feijão-de-porco.

As lectinas só começaram a ser amplamente estudadas em 1963, quando Nowell e seus colaboradores demonstraram a atividade mitogênica da lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) sobre os linfócitos, mostrando pela primeira vez a capacidade das lectinas em aglutinar células neoplásicas.

Atualmente, é bem conhecido que as lectinas vegetais exibem atividades biológicas que permitem a sua aplicação em diversas áreas científicas, que vão da medicina (BIES *et al.*, 2004; GEMEINER *et al.*, 2009; ZWIERZINA *et al.*, 2011) à agricultura (VANDERBORRE; SMAGGHE; VAN DAMME, 2011) . Com estas

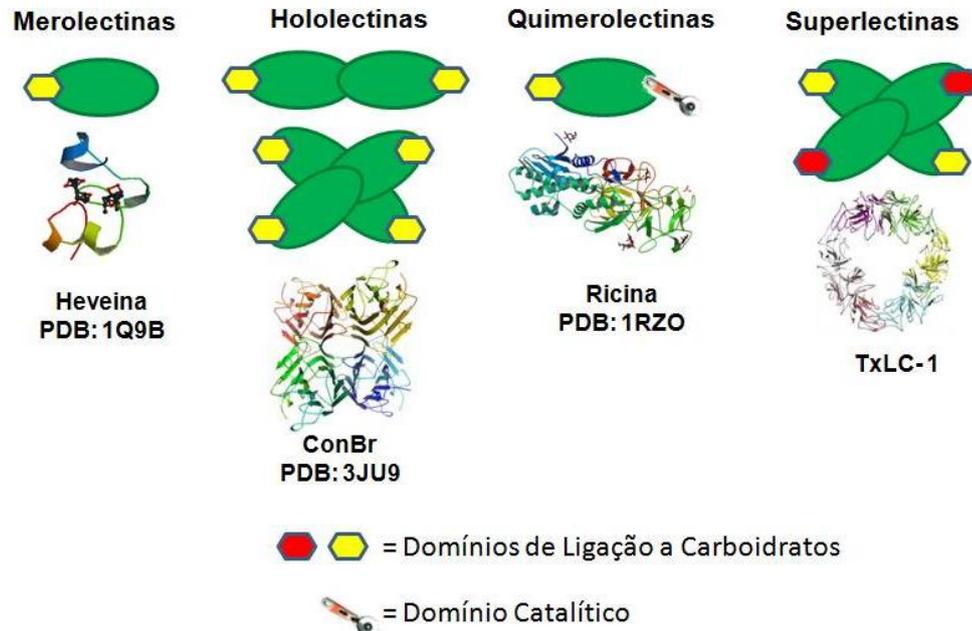
atividades, as lectinas vegetais, atraem um interesse científico ainda maior, visto que, muitas destas proteínas já são consideradas ferramentas biotecnológicas em potencial (OLIVEIRA; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2013).

Durante o processo evolutivo as lectinas conservaram características comuns, que as distinguem de todas as outras proteínas por um critério funcional bem definido, sua habilidade para reconhecer e ligar-se de forma reversível a carboidratos específicos sem alterar estruturalmente os mesmos. Essa ligação ocorre nos sítios chamados domínios de reconhecimento a carboidrato (CDR), que promovem o reconhecimento específico, em conformidade com o modelo chave-fechadura (KENNEDY et al., 1995) .

Além do CRD, que é altamente conservado em cada tipo de lectina (NI e TIZARD, 1996), a especificidade também é devido a uma série de interações químicas fracas (SHARMA e SUROLIA, 1997; WEIS e DRICKAMER, 1996; KOMPELLA et al., 2001). Essa especificidade garante às lectinas uma diversidade de atividades biológicas e propriedades bioquímicas. (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Considerando suas características estruturais, Van Damme *et al.* (1998) subdividiram as lectinas vegetais de acordo com a estrutura, em quatro classes principais: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (Figura 01).

Figura 01. Classificação estrutural das lectinas vegetais. Representação esquemática de merolectinas (Heveína; PDB: 1Q9B), hololectinas (Con-Br; PDB: 3JU9), quimerolectinas (Ricina; PDB: 1RZO) e superlectinas (TxLC-1).



Fonte: Autor, (2016)

As merolectinas são proteínas estruturalmente simples, de natureza monomérica que possuem um único sítio de ligação à açúcar por estrutura. Devido a sua natureza monovalente, este grupo de lectinas não pode aglutinar células. Quanto as hololectinas, possuem dois ou mais domínios de reconhecimento a carboidratos, idênticos ou homólogos. São geralmente proteínas oligoméricas, que se apresentam em forma de dímeros ou tetrâmeros, permitindo assim a aglutinação de células e a precipitação de glicoconjugados. Já as quimerolectinas possuem um ou mais sítios de ligação a carboidratos, e junto a eles, um outro domínio com função distinta daquela de reconhecimento a açúcar. São elas proteínas com dupla função, mas que se completam. Dependendo da quantidade de sítios de ligação a carboidratos, as quimerolectinas podem se comportar como merolectinas ou hololectinas. Como exemplos, citam-se as proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2 (RIPs). Por último, temos as superlectinas, que apresentam pelo menos dois sítios de ligação, assim como as hololectinas, porém seus sítios de ligação a carboidratos não estão relacionados estruturalmente (VAN DAMME et al., 1998b).

A existência em abundância de lectinas em muitas plantas, sugere a elas algumas funções específicas como a defesa do vegetal contra vírus, bactérias, insetos, (TRIGUEROS et al., 2003), fungos (SHARON & LIS, 1989) e herbívoros (PEUMANS & VAN DAMME, 1995); regulação de fitohormônios (SANZ-APARICIO et al., 1997); e a associação do vegetal a simbioses (SHARON & LIS, 2004).

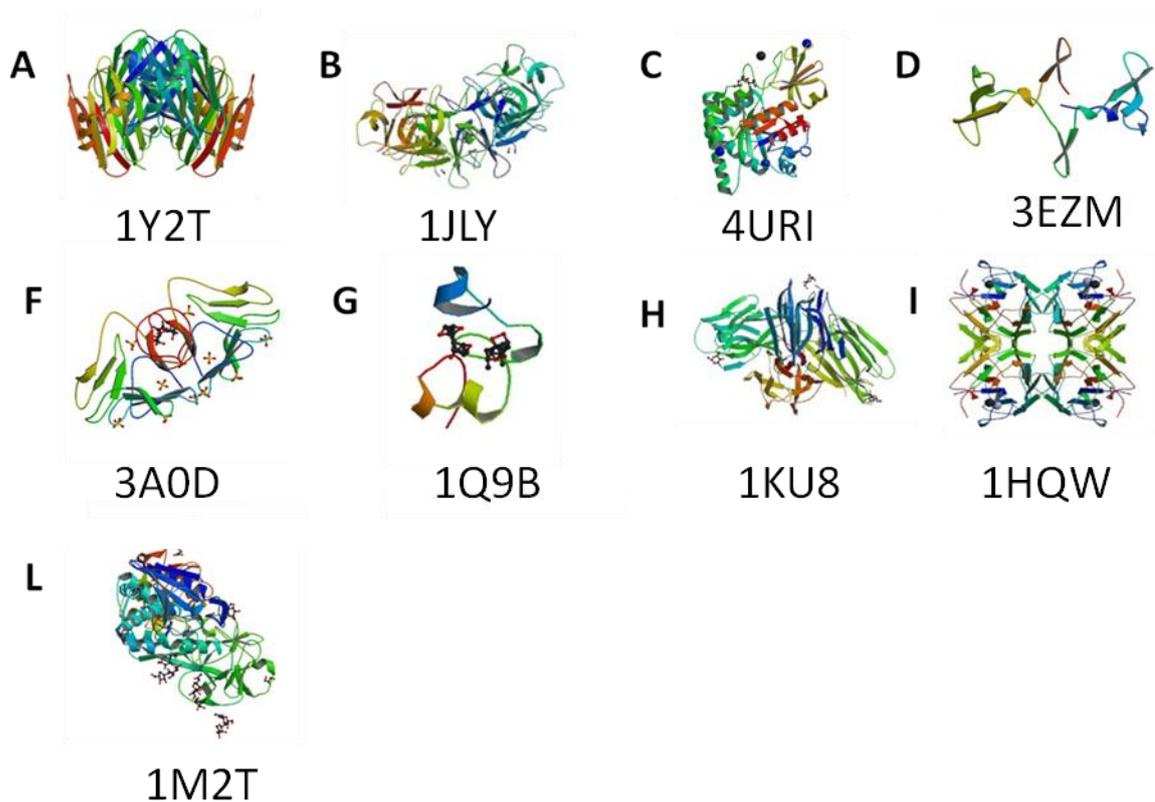
Podemos encontrar lectinas vegetais desde plantas mais simples, como os musgos (MOLINA; VICENTE, 1995), até as mais complexas, como as gimnospermas (SANTI-GADELHA et al., 2006) e angiospermas (WONG; NG, 2005; KAUR et al., 2005; CAVADA et al., 1998; MORAIS et al., 1996). As angiospermas são as mais investigadas, visto que centenas de lectinas já foram isoladas e caracterizadas de plantas pertencentes a diferentes famílias deste taxon. Elas podem ser encontradas nas diversas partes das plantas, como: folhas (RATANAIPOS et al., 2001), frutos (SAMPIETRO et al., 2001), raízes de algumas convolvuláceas (PEUMANS et al., 1997) e tubérculos (SUSEELAN et al., 2002), mas em muitas famílias elas se concentram nas sementes, principalmente no tecido cotiledonares (PUSTZAI, 1991).

Van Damme e colaboradores (1998), inicialmente, classificaram as lectinas de plantas em sete grupos, ou famílias, de acordo com as semelhanças estruturais e evolutivas. Em 2008 foram incluídas novas proteínas e redistribuídas em 12 famílias de lectinas com diferentes domínios de ligação a carboidratos (VAN DAMME et al., 2008). São elas: a) aglutininas homólogas a *Agaricus bisporus*; b) lectinas de *Amaranthaceae*; c) lectinas com atividade homóloga as quitinases de classe V; d) Lectinas de Cyanovirin; e) lectinas da família das EEA; f) lectinas da família GNA; g) lectinas com domínios heveínicos; h) lectinas relacionadas a Jacalina; i) lectinas de leguminosas; j) Lectinas com domínios LysM; k) lectinas da família de Nictaba (lectinas de floema de *Cucurbitaceae*) e l) lectinas da família ricin-B (proteínas inativadoras de ribossomo tipo 2 - RIPs tipo 2).

Até a data, todas as lectinas de plantas pertencem a uma destas 12 famílias, com a exceção de uma lectina de ligação a maltose, isolada a partir de *Dioscorea batatas* (DB3L), que não pode ser classificada em qualquer família de lectinas de plantas, tanto em termos de estrutura, como de especificidade a açúcar. Essa lectina mostra homologia de sequência com dioscorin B, isolada a partir de *Dioscorea alata*, com 90% de identidade, e a anidrase carbônica de *Arabidopsis*

thaliana, com cerca de 45% de identidade. Como DB3L adquiriu a sua atividade hemaglutinante ainda é desconhecida.

Figura 02. Classificação das Lectinas Vegetais. (A) aglutininas homólogas a *Agaricus bisporus*, aglutininase *Agaricus bisporus* (ABA); (B) lectinas de *Amaranthaceae*, amarantina; (C) lectinas com atividade homóloga as quitinases de classe V, aglutinina relacionada a quitinase (CRA); (D) lectinas de *Cyanovirin* Cynovirin-N (CV-N); (E) lectinas da família das EEA (*Euonymus europaeus* agglutinin); (F) lectinas da família GNA, *Polygonatum cyrtonema* lectin (PCL); (G) lectinas com domínios heveínicos, heveína; (H) lectinas relacionadas a Jacalina, *Artocarpus integrifolia* (Jacalina); (I) lectinas de leguminosas, *Canavalia ensiformis* (Con-A); (J) lectinas com dominios LysM; (K) lectinas da familia de Nictaba, *Cucurbitaceae phloem* lectin (CPL) e (L) lectinas da família ricin-B, *European mistletoe* lectin (ML-I).



Fonte: Autor, (2016)

Apesar das lectinas de plantas serem amplamente exploradas, a presença de lectinas em fontes animais é observada (KILPATRICK, 2002). Os

papéis das lectinas incluem endocitose e transporte intracelular (YI et al., 2001; YAMAMOTO, 2009), a indução da apoptose em células tumorais (BAH et al., 2011; FANG e NG, 2013; KIM et al., 1993), o bloqueio da infecção por HIV (TANAKA et al., 2009); regulação da adesão celular bacteriana e a migração (TANNE e NEYROLLES, 2010) e controle dos níveis de proteína no sangue (RYDZ et al., 2013). As lectinas são também conhecidas por desempenharem um papel importante no sistema imune, reconhecendo carboidratos que são encontrados exclusivamente no patógeno ou que são inacessíveis em células hospedeiras.

1.2 Atividades e potencial biotecnológicos das lectinas vegetais

As lectinas são ferramentas biotecnológicas potencialmente atraentes, pois além de serem moléculas estruturalmente estáveis, são abundantes na natureza, são relativamente fáceis de purificar, são altamente específicas para determinados carboidratos, são susceptíveis a modificações químicas e conjugação com outras macromoléculas (ZATTA e CUMMINGS, 1992).

Dentre suas aplicações, as lectinas podem ser utilizadas para o isolamento de glicoconjugados através de cromatografias de afinidade por meio da imobilização dessas moléculas em suportes insolúveis (SANTOS FILHO, 2001).

Microarranjos de lectinas tem se mostrado ferramentas valiosas para uma determinação prática do conteúdo glicídico de amostras, facilitando a análise de proteínas glicosiladas e de superfícies celulares (YUE & HAAB, 2009).

Estudos sobre a proliferação de linfócitos ou de mecanismos relativos a apoptose se fazem valer de lectinas dotadas de atividade mitogênica, como a lectina de *Cratylia mollis* (MACIEL et al., 2004), capazes de alterar o estado quiescente dessas células, induzindo a sua multiplicação. Já na histoquímica, lectinas com diferentes especificidades de ligação a carboidratos são ferramentas úteis para investigar mudanças na glicosilação e expressão de glicoconjugados que podem ocorrer no crescimento e progressão de câncer, doenças metabólicas e outras condições patológicas (SHARON & LIS, 2004). A aplicabilidade dessas moléculas estende-se ainda ao diagnóstico clínico, podendo ser empregadas como marcadores para a detecção de transformações celulares malignas. Como exemplo podemos citar as lectinas de *Vicia villosa*, que reconhece especificamente o antígeno Tn (N-acetil-galactosamídeo Ser/Thr) (MEDEIROS et al., 2000), e a lectina de *Sauromatum*

venosum, que reconhece N-acetil-lactosamina (SINGH *et al.*, 2005), ambos específicos de carcinomas. Da mesma forma, são utilizadas para distinguir o câncer de próstata e a hiperplasia benigna neste órgão (BASU *et al.*, 2003), bem como para detecção de modificações celulares em vários tecidos (KUNSTFELD & PETZELBAUER, 2001).

Diversas lectinas podem ainda apresentar aplicações terapêuticas, podendo ser utilizadas no combate de diferentes patógenos. A lectina isolada da alga vermelha *Solieria filiformis* foi eficiente ao inibir o crescimento das bactérias gram-negativas *Serratia marcescens*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus sp* e *Pseudomonas aeruginosa* (HOLANDA *et al.* 2005). Lectinas específicas de manose obtidas de monocotiledôneas apresentam ainda atividade antirretroviral, podendo ser utilizadas no combate a síndrome da imunodeficiência adquirida em humanos (AIDS) (BALZARINI *et al.*, 1991). Isso se deve ao fato dessas lectinas ligarem-se a glicoproteína da capsula viral relacionada ao reconhecimento e adesão a linfócitos, gp120, impedindo a invasão dessas células (BALZARINI *et al.*, 1992).

Devido ao fato de algumas lectinas possuírem a habilidade para mediar mucoadesão, citoadesão e a citoinvasão de drogas (GABOR *et al.*, 2004), essas moléculas foram exploradas quanto a sua utilização em sistemas de liberação de drogas. Lectina de folhas de *Bauhinia monandra* e a lectina de *Lensculinaris* foram incorporadas e também adsorvidas na superfície de nanopartículas, mostrando ser potenciais ferramentas para a utilização em medicamentos de administração oral com liberação controlada (RODRIGUES *et al.*, 2003).

As pesquisas têm mostrado que diversas lectinas são capazes de diferenciar algumas espécies de microrganismos. Lectina de germe de trigo (WGA) aglutina *Neisseria gonorrhoeae* (SCHAEFER *et al.*, 1979), lectinas de *Glycine max*, *Abrus precatorius* e *Griffonia simplicifolia*, aglutinam apenas *Bacillus anthracis* e *Bacillus mycoidis* (COLE *et al.*, 1984) entre vários bacilos.

O uso de lectinas em microbiologia clínica apresenta várias vantagens como: estabilidade, atividade específica elevada, disponibilidade comercial de várias lectinas e habilidade para revelar diferenças estruturais entre espécies de microrganismos (SLIFKIN e DOYLE, 1990).

Estudos também têm mostrado que lectinas podem ser utilizadas como: sondas diagnósticas ligantes de carboidratos nas superfícies celulares; marcador tumor-específicos com a produção de neoglicoproteínas, neoglicoenzimas, pseudopolissacarídeos, anticorpos anti-lectinas que podem ser associados a radioisótopos, biotina, enzimas, drogas tumorocidas, citotoxinas e oligonucleotídeos; como citotoxinas antitumorais, quer por ação direta quer por ativação de linfócitos; como imunotoxinas (lectinas citotóxica de plantas acopladas a anticorpos monoclonais); biomateriais para separar e analisar as glicoproteínas e glicolípidos para isolar oligossacarídeos específicos; moléculas bioadesivas no endereçamento de drogas (BIES *et al.*, 2004), e no isolamento de glicoconjugados, quando imobilizadas em suportes insolúveis (FRANCO-FRAGUAS *et al.*, 2003; BANERJEE *et al.*, 2004).

Em estudos mais recentes, realizadas por Grupta (2010), as lectinas foram utilizadas na técnica de *microarrays* para diagnóstico e prognóstico de tumores de cancro (*apud* FU *et al.*, 2011).

A ação antitumoral de lectinas tem sido observada sobre o sarcoma 180 (LI *et al.*, 2008; ANDRADE *et al.*, 2004) e sobre algumas linhagens de células tumorais humanas (LIU *et al.*, 2006; KARASAKI *et al.*, 2001). O efeito modulador da resposta imune é uma propriedade observada em algumas lectinas (GAVROVIC-JANKULOVIC *et al.*, 2008; GHOSH e MAITI, 2007).

Outras lectinas, em especial as lectinas de plantas e, dentre elas, principalmente as RIPs tipo 2, podem apresentar atividade citotóxica *in vitro*, induzindo apoptose (STIRPE *et al.*, 2007). Exemplos de lectinas comerciais com ação citotóxica para células de mamíferos são a ricina, a abrina e, em menor intensidade, a aglutinina de *Canavalia ensiformes* (Concanavalina A - Con A) e a WGA, entre outras.

As lectinas, além de seus efeitos sobre células, também têm habilidade para atuar como moléculas inseticidas contra uma variedade de espécies (SÀ *et al.*, 2008a; SÀ *et al.*, 2008b; KAUR *et al.*, 2006; DUTTA *et al.*, 2005; LEITE *et al.*, 2005) sendo seus genes utilizados na produção de transgênicos de plantas de interesse econômico (MCCAFFERTY *et al.*, 2008; RAMESH *et al.*, 2004; KANRAR *et al.*, 2002).

1.3 Lectinas de espécies do gênero *Artocarpus*

O gênero *Artocarpus* (*Moraceae*) é composto principalmente por árvores de fruta-pão e jaca. É nativo do sul e sudeste da Ásia, Nova Guiné e do Pacífico Sul, com 50 espécies. As árvores são restritas a florestas verdes na zona tropical úmida, e normalmente não ultrapassam a altitude de 1000 m (VERHEIJ e CORONEL, 1992). O gênero foi introduzido no Brasil quando a Coroa Portuguesa no século XVII trouxe exemplares de *Artocarpus heterophyllus* Lam (*Artocarpus integrifolia*), conhecida como jaqueira (PRESTES, 2000), visando a aclimação de plantas e especiarias de origem asiática (PEREIRA e KAPLAN, 2013).

Junto com os gêneros *Morus* e *Ficus*, o gênero *Artocarpus* possui grande importância econômica na parte alimentícia, além de serem todos amplamente utilizados na medicina tradicional, na agricultura e na indústria (JARRET, 1959). O gênero é de grande interesse científico devido a importância medicinal de seus metabolitos secundários e suas atividades biológicas. Dentre os metabolitos, os flavonóides representam cerca de 75% das substâncias isoladas no gênero. Além das flavonas e outras classes de substâncias fenólicas, terpenoides e fitoesteroides, temos a descrição da presença de lectinas (PEREIRA e KAPLAN, 2013).

A primeira evidência da ocorrência de uma lectina em sementes de jaca foi relatada por Chatterjee e seus colaboradores (1979), que identificaram uma lectina galactose ligante, a jacalina. Ela deu origem a uma das famílias de lectinas classificadas por Van Damme, 1998, as lectinas relacionadas à jacalina (JRL). Esta família de lectinas compreende todas as proteínas de ligação a carboidratos que partilham semelhança de sequência com a aglutinina específica antigénio-T-Thomson-Friedenreich- ou de sementes de jaca.

A jacalina é uma lectina α -D-galactose ligante, composta por quatro subunidades idênticas com massa molecular de cerca de 40 kDa (KUMAR et al, 1982). A proteína extraída das sementes do fruto da jaca é a principal proteína do extrato bruto das sementes, representando mais de 50% das proteínas presentes, além de ter várias atividades biológicas (JAGTAP e BAPAT, 2010). Ela apresenta um grande potencial na pesquisa imunobiológica incluindo o isolamento de glicoproteínas do plasma humano, como IgA₁ e proteína inibidora de C-1, a investigação de nefropatia por IgA, assim como na análise de O-glicoproteínas ligados e para a detecção de tumores (KABIR, 1998). Vários sistemas híbridos

lectina-nanopartículas têm sido amplamente utilizados no desenvolvimento de biomarcadores (FERREIRA et al., 2011), biossensores (DAI et al., 2006), ferramentas de diagnóstico e terapias para o câncer (EL-BOUBOU et al., 2010) entre outras doenças.

A espécie *A. integrifolia* apresenta outras lectinas como é o caso da ArtinM, também chamada de KM+ ou artocarpin (PEREIRA DA SILVA et al 2008). A segunda lectina isolada da espécie foi nomeada primariamente de artocarpin (DE MIRANDA et al., 1991), mas este termo já havia sido usado para designar uma lectina de *Artocarpus lakoocha* (CHOWDHURY et al, 1988). Isto levou a Santos-de-Oliveira e seus colaboradores em 1994 a propor o nome KM+ como um nome provisório alternativo para a lectina, porém outros autores continuaram a se referir a ela como artocarpin (MISQUITH et al., 1994; PRATAP et al., 2002; RANI et al., 1999; RANI et al., 2000).

A ArtinM é uma lectina de ligação a D-manose. Ao contrário da jacalina, ela não contém um N-terminal gerado por proteólise pós-traducional. Há também a ausência de um resíduo aromático no sítio de ligação da ArtinM considerando que existem quatro no sítio de ligação da jacalina. Uma comparação com lectinas de estruturas semelhantes ou sequências conhecidas, sugere que interações gerais com resíduos aromáticos são importantes para a ligação da galactose, enquanto tais interações normalmente são ausentes nos sítios de ligação a carboidratos de lectinas manose específicas (PRATAP et al., 2001)

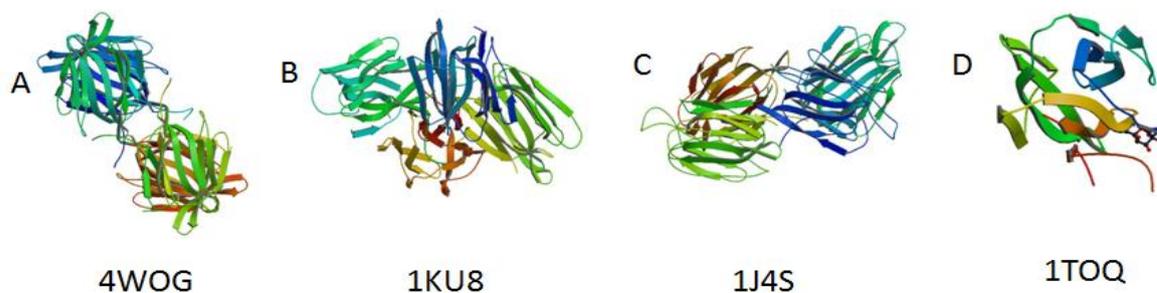
Entre suas ações biológicas, a ArtinM inclui a estimulação de macrófagos e células dendríticas para produção de IL-12 (PANUNTO-CASTELO et al., 2006), uma atividade desencadeada pela interação da ArtinM com *N*-glicanos de TLR2 (COLTRI et al., 2001) e apresenta ação contra infecções de *Leishmania* (TEIXEIRA et al., 2006; PANUNTO-CASTELO et al., 2001), e *Paracoccidioides brasiliensis* (COLTRI et al., 2008). Além disso, a ArtinM é capaz de acelerar o processo de cicatrização de feridas e regeneração de tecido epitelial (PINTO-DA-SILVA et al., 2004). Apresentando grande potencial em aplicações biomédicas e na produção de fármacos.

A frutalina é uma hololectina α -D-galactose ligante, presente em sementes de fruta-pão de caroço (*Artocarpus incisa* L.). Essa lectina é uma glicoproteína que possui cerca de 2% de carboidratos em sua estrutura. Pelo fato

desta lectina também interagir, embora fracamente, com α -D-manose, Monteiro-Moreira (2002) sugeriu uma nova classe de lectinas (englobando a frutalina e a jacalina) que possuem dois sítios idênticos capazes de ligarem carboidratos diferentes, as multilectinas.

A frutalina apresenta em torno de 98% de identidade com a jacalina. Estudos de modelagem molecular mostraram que a estrutura tridimensional da frutalina recombinante, expressa em *Escherichia coli* (*E.coli*), é homóloga a estrutura da jacalina (NEPOMUCENO, 2008). Esse estudo apontou que a frutalina é um tetrâmero formado por quatro monômeros (cadeias α e β) unidos por ligações covalentes, com quatro sítios de ligação a galactose e uma massa molecular de aproximadamente 48 kDa. Oliveira *et al.* (2008,2009) conseguiram expressar a frutalina em *Pichia pastoris* e em *Escherichia coli*. Recentemente a estrutura tridimensional da frutalina nativa foi resolvida e depositada no *Protein Data Bank* (PDB), com a especificação 4WOG, o que facilitará o entendimento de suas funções e atividades biológicas (MONTEIRO-MOREIRA *et al.*, 2015)

Figura 03. Estrutura tridimensional de lectinas do genero Artocarpus. (A) frutalina; (B) jacalina; (C) artocarpin ou AminA ou KM+; (D) lectina de A. hirsuta



Fonte: Autor, (2016)

Quanto as suas propriedades biológicas, pesquisas mostraram que a frutalina é altamente eficaz no reconhecimento e ligação seletiva a células neoplásica mamárias humanas (FERREIRA, 2001) e de tireóide (MILHOME, 2003); apresenta potencial gastroprotetor (ABDON *et al.*, 2012); propriedades anti-tumorais notáveis (OLIVEIRA *et al.*, 2011); potencial como biomarcador tumoral (OLIVEIRA *et al.*, 2009). A frutalina também é um potente ativador mitogênico de linfócitos

humanos e é capaz de se ligar a imunoglobulinas A (BRANDO-LIMA *et al.*, 2006). As aplicações biotecnológicas da frutalina ainda podem ser expandidas com sua incorporação em nanopartículas para entregas de drogas alvo (NOBRE *et al.*, 2010).

Trindade *et al.*, (2006) isolaram duas novas lectinas de ligação a quitina das sementes de *A. integrifolia*, jackin, e *A. incisa*, frutackina, que promoviam hemaglutinação e inibição do crescimento de fungos *F. moniliforme* e *S. cerevisiae*. Jackin e frutackina são homólogas uma a outra em termos de massa molecular, estrutura secundária e sequência primária. Um aspecto interessante é que elas parecem ser diferentes das lectinas de ligação a quitina mais comuns já descritas na literatura. A maior identidade de sequência com outras lectinas de ligação de quitina foi de 28%, obtida com a lectina vegetal PL-C da família das lectinas de domínio Heveínico (lectin-C de *Phytolacca americana*) (HAYASHIDA *et al.*, 2003)

Primariamente chamada de artocarpina (CHOWDHURY *et al.*, 1988), a aglutinina de *Artocarpus lakoocha* (ALA) é uma lectina heterodímerica (16 kD e 12 kD) com massa molecular de 28 kDa, encontrada em sementes de *A. lakoocha*. Apresentam como ligante específico, Gal/GalNac e seus derivados (WU *et al.*, 2003). Estudos mostram a presença de duas isoformas na espécie, a ALA-I e a ALA-II, com características bastante semelhantes (WONGKHAN *et al.*, 1995). ALA apresenta grande potencial inibidor da proliferação das linhas de células leucêmicas, como foi demonstrado por Chatterjee *et al.*, (2007).

A lectina de *Artocarpus hirsuta* é um tetrâmero $\alpha_2 \beta_2$. Ela é composta por subunidades idênticas α e β , desprovidas de ligações dissulfeto intercadeias, semelhantes para *A. integrifolia* e *A. lakoocha*. É uma lectina α -galactose específica com massa molecular de 60 kDa [2 ± 4] e alta especificidades para metil- α -D-galactopiranosil (Me α -gal), mas não possui afinidade para α ou β -galactose (MADHURA *et al.*, 1998.). Ela também apresenta atividade biológica como potente inibidor do crescimento, com atividade anti-fertilidade, em *Tribolium castaneum* (GURJAR *et al.*, 2000).

1.4 Frutalina Recombinante

Os inúmeros estudos biológicos desencadearam uma grande demanda por frutalina. Uma maneira de se conseguir grandes quantidades da proteína é através da sua expressão heteróloga em microorganismos. Além disso, a expressão

e a produção das isoformas puras da lectina pode contribuir para esclarecer a especificidade da ligação lectina-açúcar.

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* foi a primeira a ser escolhida como sistema de expressão, devido à sua metodologia de expressão bem conhecida, especialmente para a secreção de proteínas recombinantes (MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005; DARLY e HEARN, 2005). É um sistema eucariótico capaz de fazer modificações pós-traducionais tais como a glicosilação. Com as isoformas de frutalina apresentando alto grau de glicosilação a presença ou ausência das cadeias de carboidratos laterais pode apresentar efeitos significativos sobre as suas propriedades funcionais e / ou físicas. A caracterização da lectina recombinante revelou uma especificidade a carboidratos bastante semelhante à descrita para a frutalina nativa (Me- α -galactose). A caracterização também mostrou um pequeno aumento no peso molecular de uma das cadeias, causado por uma *N*-glicosilação parcial da proteína recombinante e a não clivagem da ligação entre as cadeias α e β da proteína, mas nada que modificasse sua ação (OLIVEIRA *et al.*, 2008)

Frutalina recombinante solúvel também foi expressa com sucesso em cepas *E. coli* por clonagem de cDNA, embora quantidades significativas da lectina recombinante, como forma de proteína insolúvel, se acumulem em todas as diferentes condições de cultura testadas (OLIVEIRA *et al.*, 2009)

O sistema de expressão de *E. coli* foi considerado para a produção de frutalina, porque as modificações pós-traducionais em frutalina nativa não parecem ser importantes para a especificidade de ligação à açúcar e para a funcionalidade das lectinas relacionadas à jacalina com sítios de ligação a galactose (OLIVEIRA *et al.*, 2008; SAHASRABUDDHE *et al.*, 2004; SAHASRABUDDHE *et al.*, 2006). Além disso, a *E. coli* é o sistema mais simples e econômico para a produção de proteínas recombinantes (YIN *et al.*, 2007)

Assim como a frutalina recombinante obtida de cepas de *P. pastoris*, a proteína recombinante produzida em *E. coli* apresenta-se como uma proteína de banda única, com uma massa molecular de cerca de 17 kDa, o que é consistente com o peso molecular previsto da sequência clonada de frutalina. Ao contrário da frutalina nativa, as cadeias α e β da lectina recombinante, provavelmente estão ligadas pelo peptídeo ligante " T-SS-N ", fazendo uma proteína de cadeia simples, como ocorreu com jacalina expressa em *E. coli* (SAHASRABUDDHE *et al.*, 2004). A

Frutalina recombinante não sofre qualquer clivagem proteolítica em qualquer um dos sistemas de expressão utilizados, *E. coli*, ou *Pichia*, por isso, é altamente possível que a clivagem do ligante seja uma etapa de processamento específico de eucariotos superiores (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Os ensaios feitos com a frutalina recombinante desse sistema de expressão revelaram que ela tem uma especificidade de ligação a carboidratos qualitativamente idêntica à lectina frutalina nativa. Assim, a frutalina funcional pode ser facilmente produzida em um sistema de expressão heteróloga em *E. coli*. No entanto, outras melhorias são necessárias para aumentar a quantidade de frutalina recombinante pura obtida (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

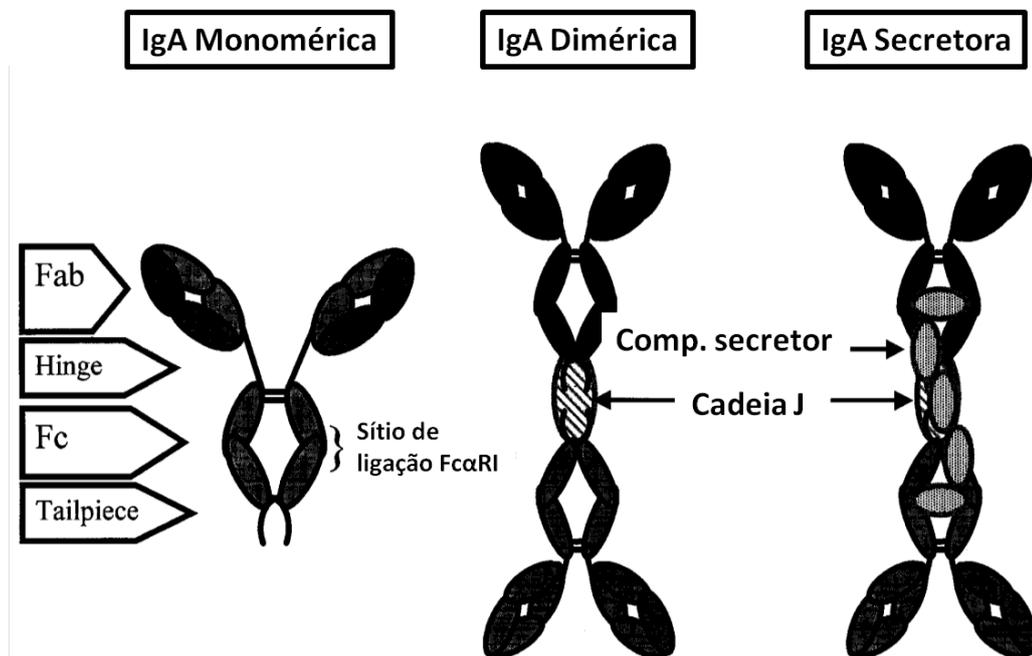
Dentre as potenciais ações da frutalina recombinante temos a sua utilização como potenciais biomarcadores histoquímicos para o cancro da próstata (OLIVEIRA et al., 2009) e como poderoso agente antiproliferativo de células de câncer cervical (HeLa) (OLIVEIRA et al., 2011). A frutalina produzida por Pichia pastoris e purificada por cromatografia de exclusão molecular também apresentam um potente efeito antiproliferativo nas células tumorais de endocarcinoma do cólon (HCT116) induzindo a apoptose por uma via dependente das caspases e independente da p53. O mesmo efeito antiproliferativo não é observado para a frutalina recombinante produzida em E. coli (MENDONÇA, 2013; MENDONÇA 2014).

1.5 Imunoglobulina A (IgA)

A imunoglobulina A (IgA) foi identificada pela primeira vez em 1959 por Heremans *et al.* Representa a mais abundante classe de anticorpos na superfície de mucosas (MACPHERSON *et al.*, 2000) e a segunda classe prevalente no soro humano. No soro humano a IgA é predominantemente monomérica e constitui 15-20% da quantidade total de imunoglobulinas sendo dividida em subclasses, IgA 1 (90%) e IgA 2 (10%). A diferença mais significativa entre as subclasses é que a IgA1 apresenta uma região de charneira com 13 resíduos aminoácidos contendo de 3 a 5 sítios de ligação a carboidratos (CHINTALACHARUVU *et al.*, 2002; HERR *et al.*, 2003). Ambos os isotipos de IgA existem nas isoformas monomérica, dimérica e secretora (DECHANT e VALERIUS, 2001)

A Imunoglobulina A secretora (sIgA) é a imunoglobulina dominante na superfície da mucosa do intestino, dando a mucosa defesa especializada inata e adaptativa contra patógenos ingeridos e sua toxinas (RENEGAR et al., 1994; RUSSELL et al., 1999; PHALIPON et al., 2002). A sIgA é um complexo protéico que consiste de dois monômeros idênticos de IgA, ligados por uma cadeia J (16 kDa) unidos a um componente secretor (70 kDa). A cadeia J apresenta um potencial local de N-glicosilação enquanto o componente secretor apresenta sete potenciais locais de N-glicosilação (ROYLE et al., 2003; JOHANSEN et al., 2003; MOSTOV, 1994).

Figura 04. Representação esquemática das três isoformas de IgA



Fonte: Autor, (2016), adaptada de Dechant e Valerius, 2001

A IgA desempenha um importante papel na proteção das superfícies de mucosa. É eficaz na neutralização de toxinas de *Clostridium difficile* (STUBBE et al. 2000); na neutralização de vírus, impedindo sua ligação ao receptor ou a fusão do vírus com a membrana da célula (GAN et al., 1997; SIXBEY e YAO, 1992); impede a ligação de bactérias a superfícies de mucosas inibindo a penetração de bactérias comensais (MACPHERSON e UHR, 2004); atenua a resposta pró-inflamatória induzida por LPS (FERNANDEZ et al., 2003).

No colostro humano há uma grande concentração de IgA, predominantemente na forma de sIgA nos primeiros dias de lactação e vai caindo

rapidamente após dias de vida do recém-nascido. Esse anticorpo oferece proteção efetiva ao recém-nascido contra bactérias, fungos, vírus e parasitas (THOMAS *et al.*, 1993; WAITERSPIEL *et al.*, 1994; TORRES e CRUZ, 1993; COSTA-CARVALHO *et al.*, 1993; CAVALCANTE e ANDRADE, 1995). A proteção de lactentes da colonização de nasofaringe pelo *Haemophilus influenzae*, que é um dos principais responsáveis pela alta incidência de otite média aguda, é um dos exemplos (HARABUCHI *et al.*, 1994). Na doença diarréica infantil, em que um dos principais agentes é a *E. coli*, a sIgA possui papel relevante porque impede a aderência, neutraliza a enterotoxina e pode, também, atuar na cápsula, facilitando a lise da bactéria. Nas parasitoses intestinais, como a giardíase, os anticorpos sIgA contra giardia estão associados à prevenção da doença diarréica, mas não contra a infecção (COSTA-CARVALHO *et al.*, 1993; VASSILEV e VELERA, 1996).

Dos nascidos vivos, em média 1 a cada 700 apresenta deficiência de IgA, o que a torna uma das mais comuns imunodeficiências congênitas conhecidas. Quadros recorrentes de infecções graves principalmente em vias aéreas superiores e inferiores e, também, no trato gastrointestinal se apresentam em pacientes com imunossupressão de IgA (MAJKOWSKA-SKROBEK, 2003).

IgA têm atraído cada vez mais atenção como potenciais terapias para doenças infecciosas e malignas. Os anticorpos IgA foram demonstrados para acionar efetivamente explosão respiratória e fagocitose de vários patógenos microbianos por leucócitos humanos (VAN EGMOND *et al.*, 2001; MONTEIRO e VAN de WINKEL, 2003; VINHOS e HOGARTH, 2006) e serem extremamente eficazes no recrutamento de células polimorfonucleares (PMN) para a citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC) contra células tumorais (HULS *et al.*, 1999; DECHANT *et al.*, 2002; OTTEN *et al.*, 2005; DECHANT *et al.*, 2007).

A utilização da IgA em terapias imunológicas aumentou a demanda pela imunoglobulina, favorecendo o aumento do desenvolvimento de métodos comerciais utilizados para sua purificação.

Após o fracionamento industrial do plasma para eliminação e inativação de vírus, tais como precipitação com etanol e pasteurização, utilizados para eliminar o risco de transmissão de vírus que possuem envelopes, como o HIV e os vírus da hepatite B e C (RUPOLO *et al.*, 1998), o fracionado é submetido a passos

cromatograficos. Vários métodos comerciais foram desenvolvidos para a purificação por afinidade de IgA. Estes incluem peptídeo H, SSL7 e jacalina imobilizada.

A purificação de IgA, mais especificamente IgA1 utilizando a lectina jacalina (MOREIRA e AINOZ, 1978) baseia-se na sua capacidade de se ligar especificamente a D-galactose (PEREIRA et al., 1980). A IgA1 possui quatro grupamentos característicos compostos por D-galactose na região de charneira (BAENZIGER e KORNFELD, 1974) o que explica a especificidade, já que a IgA2 possui uma deleção de 13 aminoácidos e conseqüentemente deleção dos quatro resíduos de acetilgalactosamina (TOMANA et al, 1974; MESTECKY, 1976).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Produzir heretológicamente frutalina em *Pichia pastoris*, caracterizar suas propriedades biofísicas e avaliar sua aplicação no isolamento de imunoglobulinas A1 secretoras (sIgA1) humanas.

2.2 Específicos

- Purificar frutalina nativa em escala preparativa.
 - Expressar e purificar frutalina recombinante.
 - Avaliar a estabilidade da frutalina recombinante (rFrutalina) em função do pH e temperatura utilizando métodos biofísicos (dicroísmo circular, fluorescência, DLS e potencial zeta).
 - Imobilizar a rFrutalina em agarose para produzir matrizes de afinidade para o isolamento de IgA1
 - Purificar IgA1 de colostro utilizando as matrizes com a rFrutalina imobilizada;
 - Validar o êxito das purificações da IgA₁ através de ensaios eletroforéticos de imunodeteção;
 - Comparar a eficiência entre matriz agarose-rFrutalina e a matriz comercial *Immobilized Jacalin*®
-

3 MATERIAIS

3.1 Vegetal

Sementes de fruta-pão de caroço (*Artocarpus incisa* L.) foram utilizadas para a obtenção da frutalina nativa. Essas sementes foram removidas de frutos coletados de plantas encontradas no município da Pacatuba, Estado do Ceará. Foram coletados frutos maduros, no período compreendido entre os meses de maio e junho. Após serem removidas do fruto, os tegumentos foram retirados, lavadas com água destilada e armazenadas no freezer (- 20 °C) até o uso nas etapas posteriores.

3.2 Animal

Foram utilizados de coelhos albinos (raça Nova Zelândia) adultos e sadios obtidos do Setor de Cunicultura do Departamento de Zootecnia-UFC, mantidos no Biotério do DBBM, em gaiolas apropriadas de livre acesso à ração e água.

3.3 Fungo

A estirpe de *Pichia pastoris* usada para expressar a cadeia alfa da frutalina foi a KM71 (*Invitrogen*) com os fenótipos His⁻ e Mut^s (*Metanol utilization slow*).

3.4 Colostro humano

O colostro humano foi obtido dentro das primeiras 48 horas de pós-parto, de parturientes saudáveis voluntárias, atendidas na Maternidade Escola da Universidade Federal do Ceará. A coleta foi feita por profissionais qualificados em parturientes, após a assinatura do “Termo de Consentimento Consciente” conforme previsto na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Foram selecionadas doadoras com exames de sangue normais, que não tivessem tomado qualquer tipo de antibiótico durante a gestação, que tivessem feito pré-natal, com exames sorológicos negativos, não fumantes ou usuárias de drogas e com idades entre 18 e 35 anos.

3.5 Reagentes

Cloreto de sódio; corantes (*Coomassie brilliant blue*); D-galactose; albumina sérica bovina; acrilamida; bis-acrilamida; adjuvantes completo e incompleto de Freund's; acetona; 2-mercaptoetanol; fosfato de sódio; fenol; anticorpos primários e secundários, metanol, kit para quantificação de IGA, Tris [2-Amino-2-(hidroximetil)]; matrizes cromatográficas: *Immobilized Jacalin*®; agarose-D-galactose; Sepharose-Proteína A. Os demais reagentes foram utilizados em grau analítico.

4 MÉTODOS

4.1 Preparação da farinha das sementes de *Artocarpus incisa*.

Após o descongelamento, as sementes de *A. incisa* foram fragmentadas, delipidadas com acetona e colocadas na capela por 8 h. Os fragmentos secos foram triturados em moinho rotatório e farinha obtida foi acondicionada em frascos hermeticamente fechados e mantidos na geladeira (7 °C) até a utilização.

4.2 Obtenção do extrato total da farinha de sementes de *A. incisa*.

A extração das proteínas de *A. incisa* foi feita suspendendo a farinha em NaCl 150 mM, na proporção 1:10 (m/v), mantendo-a sob agitação contínua por 30 minutos à temperatura ambiente. O extrato foi centrifugado a 8000 x *g* por 30 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi coletado e o resíduo utilizado para uma reextração nas mesmas condições. Por fim, os sobrenadantes obtidos foram reunidos para compor o extrato total.

4.3 Purificação da frutalina nativa

O extrato total da farinha de sementes de *A. incisa* foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna de agarose-D-galactose (Sigma). A coluna contendo 10 mL da matriz de afinidade foi inicialmente equilibrada com NaCl 150 mM. Essa mesma solução também foi usada para remover proteínas não ligantes. Para a remoção da frutalina retida na matriz, a coluna foi eluída com galactose 100 mM contendo NaCl 150 mM. As frações contendo a frutalina nativa foram coletadas e agrupadas num mesmo recipiente. A fração total resultante foi dialisada (1X) contra ácido acético 0,1 M por 2h e dialisada (3X) contra água ultrapura, com trocas a cada 1h, sempre com agitação. A concentração proteica das frações foi monitorada pela leitura da absorbância a 280 nm. Alíquotas da fração purificada foram analisadas por SDS-PAGE 15% para confirmar a presença da lectina nativa.

4.4 Expressão da frutalina recombinante em *P. pastoris*

Inicialmente as células de *P. pastoris* KM71H transformadas foram plaqueadas em meio YPD-agar e incubadas *overnight* (16 h) a 30 °C. Com o auxílio

de uma alça de platina, parte da cultura crescida foi inoculada em 100 mL de BMGY (*Buffered minimal glycerol medium*: 100 mM fosfato de potássio pH 6,0; 1% (v/v) glicerol; 1,34% (p/v) YNB; 4×10^{-5} % (p/v) biotina) e mantida a 30 °C, com agitação contínua de 200 rpm por 12 horas. Após atingir a densidade óptica desejada ($DO_{600nm}=3,0$), a cultura foi centrifugada a 4000 x g por 10 min, à temperatura ambiente. A biomassa precipitada foi ressuspendida em 50 mL de meio BMMY (*Buffered minimal metanol medium*: 100 mM fosfato de potássio pH 6,0, 0,5% (v/v) metanol, 1,34% (p/v) YNB, 4×10^{-5} % (p/v) biotina) para indução da expressão. A cultura induzida com metanol foi incubada a 15 °C, sob a agitação contínua (200 rpm), na qual foi adicionado diariamente, metanol 0,5% (v/v) por 4 dias. Após o período de indução, a cultura foi centrifugada a 4000 x g por 10 min a 4°C. As células foram descartadas e o sobrenadante foi utilizado na etapa de purificação da frutalina recombinante.

4.5 Purificação da frutalina recombinante (rFrutalina)

Para precipitar os sais existentes no meio, o pH do sobrenadante foi ajustado para 7,5, por adição de NaOH 10 N, os quais foram removidos em duas etapas de centrifugação (10 minutos a 4000 x g e 4 °C). Em seguida, o sobrenadante foi filtrado (em filtros de 0,22 µm), dialisado com tampão PBS pH 7,4 e concentrado em tubos Amicon® de 10 kDa (Millipore) até volume final de 2-3 mL. Alíquotas da fração concentrada foram analisadas por SDS-PAGE para confirmar a presença da lectina recombinante. Para a purificação completa da rFrutalina, frações concentradas foram submetidas à cromatografia de afinidade em coluna de agarose-D-Galactose (Sigma). A coluna contendo 10 mL da matriz de afinidade foi inicialmente equilibrada com tampão PBS pH 7,4. Esse mesmo tampão também foi usado para remover proteínas não ligantes. Para eluir a rFrutalina retida na matriz, a coluna foi submetida a um fluxo de 0,5 mL/min de uma solução de galactose a 100 mM contendo NaCl a 0,15 M. A concentração proteica das frações cromatográficas foi monitorada pela leitura da absorbância a 280 nm. As frações contendo a frutalina recombinante foram coletadas e agrupadas num mesmo recipiente. A fração total resultante foi dialisada (1X) contra ácido acético 0,1 M, dialisada (3X) contra água ultrapurae liofilizada para utilização posterior. Alíquotas da fração purificada foram

analisadas por SDS-PAGE e por *Western blot* para confirmar a presença da lectina recombinante.

4.6 Dosagem de proteínas solúveis

A dosagem de proteínas foi realizada conforme o método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando a albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Foram utilizadas amostras à 25° C e amostras submetidas à tratamento térmico à 100 °C por 5 minutos em banho seco.

4.7 Eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS).

Os ensaios eletroforéticos em gel de poliacrilamida na presença de SDS foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970), adaptada para uso de placas. Foi utilizado um gel de empilhamento de 3,5% de acrilamida em tampão Tris-HCl 500 mM (pH 6,8) e um gel de separação com 15% de acrilamida em tampão Tris-HCl 500mM (pH 8,8) contendo SDS 1%. As corridas eletroforética foram realizadas a 25 mA e uma voltagem inicial de 100 V. As amostras foram preparadas em tampão Tris-HCl 62,5 mM (pH 8,3) contendo SDS 1%, β -mercaptoetanol 0,1%, sacarose e azul de bromofenol 1%. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100 °C por 5 min e centrifugadas a 1000 x g por 5 min à temperatura ambiente. As bandas proteicas foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue* R-250 a 0,05 %, preparado em uma solução de metanol:ácido acético:água (1:3,5:8, v/v/v) ou reveladas com nitrato de prata, segundo a metodologia descrita por Blum *et al.*, 1987.

4.8 Determinação da atividade hemaglutinante

Para avaliar a atividade das frutalinas (nativa e recombinante) purificadas, ensaios de atividade hemaglutinante foram realizados segundo o método descrito por Moreira & Perrone (1977). Resumidamente, a 50 μ L de uma solução de NaCl 150 mM, foi adicionado igual volume da solução das frutalinas nativa e recombinante (com concentração de 1 mg/mL) e desta solução, foram feitas diluições seriadas (1:2). Às diferentes diluições de proteína, foram adicionados 50 μ L de uma suspensão de hemácias de coelho (a 2%), e a mistura deixada em estufa (ou banho Maria), a 37 °C por 30 minutos, seguidos de outros 30 minutos à temperatura

ambiente. O processo de aglutinação foi observado a olho nu. Os títulos de hemagutinação foram obtidos em termos de unidade hemagutinante (H.U.) como sendo o inverso da maior diluição ainda capaz de apresentar hemaglutinação visível.

4.9 Produção de anticorpos policlonais anti-frutalina

Os anticorpos anti-frutalina foram produzidas em coelho albino adulto (14 meses de idade) imunizado com a lectina nativa. A sensibilização inicial foi feita por via intramuscular, na coxa, com uma emulsão contendo a lectina (2 mg) e o adjuvante completo de Freund (1:1; v:v). Antes da imunização, o animal foi submetido a uma primeira sangria para coletar o soro controle (pré-imune). Após 21 dias, foi administrada subcutaneamente, no dorso, uma dose de reforço de igual conteúdo de lectina emulsionada em adjuvante incompleto de Freund (1.1; v/v). Antes da dose-reforço, o animal foi submetido a uma segunda sangria e o sangue coletado (15 mL) foi deixado em repouso por uma hora a 37 °C. O soro foi obtido por centrifugação a 4.000 x g por 10 minutos. Em seguida, foram feitas sangrias e administradas doses adicionais de reforços a intervalos de 7 dias, até que fosse acumulada uma quantidade de soro satisfatória. O soro obtido foi submetido a fracionamento com sulfato de amônio 30 % de saturação, para obtenção da fração rica em gama-globulinas. Esta fração foi posteriormente submetida à diálise sequencial usando-se água e tampão acetato 50 mM a pH 5,0, alternadamente (3X). Esse material foi centrifugado a 15.000 x g, 20 min, a 4 °C, e o precipitado descartado. O sobrenadante foi submetido à cromatografia em coluna de Sepharose-proteína A. A coluna foi equilibrada com o tampão PBS pH 7,4 e a fração não-retida foi eluída com mesmo tampão. A fração retida (rica IgGs) contendo o anticorpo anti-frutalina foi eluída com o tampão glicina 0,1 M pH 2,5 contendo NaCl 0,15 M. A fração eluída foi dialisada com o tampão PBS pH 7,4 e mantida sob refrigeração para os ensaios de *Western blot*.

4.10 Western blot

Para a execução da técnica de *Western blot*, primeiramente as amostras (frutalina nativa e rFrutalina) foram aplicadas no gel SDS-PAGE 15 %. Após a eletroforese, as proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A membrana foi colocada a reagir com o anticorpo primário. A

reatividade foi detectada pelo anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina, e, para o desenvolvimento da coloração foram utilizados os agentes cromogênicos NBT e BCIP (Sigma). Para o procedimento de transferência foi utilizado o aparelho *TransBlot SemiDry* (BioRad).

4.11 Eletroforese bidimensional (2D)

Foram feitas eletroforeses bidimensionais para avaliar a presença de isoformas da frutalina nativa e confirmar o *pI* da rFurtalina. Aproximadamente 15-20 µg de cada lectina foi carregada diretamente no gel de focalização com gradiente de pH imobilizado, na faixa de 3 a 10, de 11 cm ou 13 cm (*Immobiline IPG strips* – GE Healthcare). Em escala preparativa, até 1000 µg (1 mg) de proteínas foram carregados em géis de 18 cm, com a mesma faixa de pH imobilizado. A focalização foi feita num equipamento *Multiphor II* (GE Healthcare) acoplado a um circulador termostático ou ETTANphor, contendo sistema de troca de calor do tipo Peltier (GE Healthcare). Os parâmetros de focalização foram obtidos experimentalmente. Em geral, os parâmetros adotados são os descritos em Görg *et al.* (2000). Após a focalização as tiras de IPG foram equilibradas sob agitação em solução (Tris 50 mM, glicerol 30 %, uréia 6 M, SDS 2% e azul de bromofenol) com DTT (1% p/v) por 15 minutos para a redução das proteínas e, em seguida, alquiladas com IAA (3% p/v) também em solução de equilíbrio por 15 minutos. Terminado o equilíbrio as tiras foram mergulhadas em tampão de corrida por 10 segundos para livrá-los do excesso de solução de equilíbrio. Logo após foram postos no topo do gel da segunda dimensão e fixados com tampão de corrida contendo ágar 0,5%. A segunda dimensão (2-DE/SDS-PAGE) foi realizada com géis de poliacrilamida 12,5% T/2,7% C (monomero/*cross-linker*) conforme Laemmli, cujos tamanhos foram de 160x140x1 mm, quando analítico e de 200x220x1,5 mm, quando preparativo. Os sistemas de eletroforese empregados foram *Hoefler SE600* (GE Healthcare), correndo simultaneamente quatro géis de 160x140x1 mm ou *DaltSix* (GE Healthcare), correndo seis géis 200x220x1,5 mm. Terminada a corrida, a detecção das proteínas resolvidas em 2-DE/SDS-PAGE foi feita conforme a metodologias proposta por Schevchenko *et al.*(2001) A análise dos géis bidimensionais foi feita através da digitalização das imagens captadas em *ImageScanner II* (GE Healthcare) e analisadas utilizando o programa *ImageMaster 2D Platinum* (GE Healthcare).

4.12 Caracterização biofísica da rFrutalina

4.12.1 Avaliação do padrão conformacional da rFrutalina e predição da estrutura secundária

A avaliação do padrão conformacional da rFrutalina foi feita utilizando a técnica espectrofotométrica de dicroísmo circular (CD). As medidas de CD foram realizadas em um espectropolarímetro J-815 da JASCO. Inicialmente foi utilizada uma alíquota de 100 μ L de amostra proteica contendo 20 μ g da rFrutalina em tampão PBS pH 7,4. As medidas foram feitas numa cubeta de quartzo com 1 mm de caminho ótico, à temperatura controlada de 25 °C. Primeiro, foi obtido um espectro do branco, ou seja, apenas da solução do tampão de solubilização da proteína, para que não houvesse interferência do tampão. As contribuições do tampão, obtidas sob condições idênticas, foram subtraídas e todos os espectros de CD foram corrigidos a fim de eliminar quaisquer efeitos de ruído. Foi feita então, uma varredura de 190 a 250 nm aplicando a velocidade de 50 nm/min, registrando 16 acumulações. As análises dos espectros de CD para a predição quantitativa da estrutura secundária da rFrutalina foram feitas utilizando os programas *SELCON 3* e *CONTIN* (SREERAMA e WOODY, 2000).

4.12.2 Efeito da variação de pH na estabilidade conformacional da rFrutalina

A avaliação da estabilidade conformacional da rFrutalina frente a variação de pH foi feita utilizando o CD, conforme descrito no item 4.12.1. Foram utilizadas alíquotas de 100 μ L de amostra proteica (contendo 20 μ g da rFrutalina) em tampão acetato-fosfato-borato 20 mM ajustado para diferentes valores de pH (3, 5, 7, 8, 9, 10 e 12). Foram realizadas varreduras de 190 a 250 nm aplicando a velocidade de 50 nm/min, registrando 8 acumulações. Os programas utilizados para processar os dados foram o *Spectra ManagerTM II* (que faz parte do pacote de *softwares* adquiridos junto com o equipamento) e *Origin®*

4.12.3 Termoestabilidade da rFrutalina

A termoestabilidade da rFrutalina também foi avaliada por CD, utilizando um intervalo de temperatura de 20 a 90°C. Foi utilizada uma alíquota de 100 μ L de

amostra proteica (contendo 20 μg da rFrutalina em tampão PBS pH 7,4). Os espectros foram obtidos a cada 5 $^{\circ}\text{C}$, utilizando um tempo médio de equilíbrio de 2 min. O sinal de CD a 218 nm ($\theta_{218\text{nm}}$) foi utilizado para monitorar o efeito da temperatura e determinar a temperatura de transição para o estado desenovelado da proteína. Os programas utilizados para processar os dados foram o *Spectra Manager*TM II e *Origin*®

4.12.4 Fluorescência intrínseca da rFrutalina

As medidas de emissão da fluorescência foram feitas a 25 $^{\circ}\text{C}$ em um espectrofluorímetro modelo *Cary Eclipse Varian*. As amostras foram excitadas em 295 nm e a emissão foi monitorada no intervalo de 300 a 450 nm, usando cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. A concentração final da rFrutalina usada nos ensaios foi 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em tampão PBS pH 7,4. Após a coleta, foi feita a subtração do espectro do tampão afim de excluir a interferência do espalhamento de luz. Em todas as medidas, foram usados filtros ópticos de 295 nm no compartimento de emissão do equipamento.

4.12.5 Efeito do pH sobre a fluorescência intrínseca da rFrutalina

O efeito do pH sobre a conformação da rFrutalina também foi avaliado pela fluorescência intrínseca da proteína. As medidas de fluorescência foram realizadas conforme descrito no item 4.12.4, utilizando a mesma concentração proteica em tampão acetato-fosfato-borato 20 mM ajustado para diferentes valores de pH (3, 5, 7, 9 e 12).

4.12.6 Efeito do açúcar ligante sobre a fluorescência intrínseca da rFrutalina

O efeito do açúcar ligante sobre a conformação da rFrutalina também foi avaliado pela fluorescência intrínseca da proteína. As medidas de fluorescência foram realizadas conforme descrito no item 4.12.4, utilizando a mesma concentração proteica. Antes das medidas, uma alíquota da proteína foi incubada com D-galactose 100 mM por 1 hora, a temperatura ambiente.

4.12.7 Espalhamento dinâmico de luz da rFrutalina

As características de tamanho de rFrutalina foram analisadas pelo espalhamento dinâmico de luz (DLS) o sistema Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Reino Unido). Este equipamento determina o raio hidrodinâmico (R_s) de uma determinada partícula (de 0,6 nm até 6 μm) utilizando a técnica de DLS e interpreta o resultado utilizando a equação de Stokes-Einstein. O sistema Nano-ZS utiliza um laser de 633 nm e um ângulo de dispersão fixo (173 °). Foram usadas alíquotas da rFrutalina (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), em tampão de acetato-fosfato-borato 20 mM ajustado para diferentes valores de pH (3-10). Essas alíquotas foram primeiramente filtradas em membranas de 0,22 μm (Millipore, EUA), centrifugou-se a 16000 x g por 10 minutos, e subsequentemente colocada numa cubeta de quartzo antes da medição. O raio hidrodinâmico (R_s) foi determinado a partir de uma segunda ordem acumulante para ajustar a intensidade da função de auto-correlação. Os R_s determinados foram convertidos em massa molecular (kDa) usando o software Zetasizer.

4.12.8 Potencial zeta da rFrutalina

O potencial zeta (ζ) é medido utilizando a técnica conhecida como espalhamento de luz eletroforético (ELS) onde mede-se a velocidade de uma partícula movimentando-se em um determinado líquido quando um campo elétrico é aplicado. O valor da velocidade é convertido para o valor do potencial zeta da partícula. Nesta análise, as medidas de ELS para determinar o potencial zeta médio da rFrutalina também foram realizadas utilizando o Zetasizer Nano-ZS. As medidas foram realizadas a 25 °C, utilizando a rFrutalina a uma concentração de 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em tampão de acetato-fosfato-borato 20 mM ajustado para diferentes valores de pH (3-12). O Zetasizer Nano-ZS mede a mobilidade electroforética (μ_e) e converte o valor a um potencial zeta (mV) através uma equação de Henry (Henry e Rees, 1991)

4.13 Imobilização da rFrutalina em agarose-CNBr ativada

O processo de imobilização da rFrutalina foi baseado na metodologia descrita por March *et al.* (1974) com modificação. As cromatografias foram padronizadas para o uso de colunas com 10 mL de gel. As colunas (suportes com filtros) apropriadas foram obtidas da *BioRad*®. Os parâmetros como: fluxo de eluição das colunas, volume das frações coletadas e temperatura de trabalho também foram

padronizados e validados. A matriz comercial *Immobilized Jacalin*[®] (Pierce-EUA) foi utilizada na etapa comparativa. De acordo com o fabricante, essa matriz é constituída de gel de agarose reticulada com epícloridrina (4% agarose) e ativada com brometo de cianogênio. Também, segundo o fabricante, a densidade do ligante imobilizado é de ~4,0 mg lectina/mL de gel e sua capacidade de ligação é de 2 mg de IgA humana/mL de gel.

Foram testadas amostras da rFrutalina (na concentração de 4 mg/mL de matriz) no processo de imobilização na agarose ativada. Em seguida, essas amostras foram adicionadas as matrizes ativadas e mantidas sob agitação a 4 °C por 2 minutos. Foram avaliados diferentes tempos de imobilização (2, 6 e 12 horas) objetivando otimizar o processo e validar a metodologia. Após os períodos testados, foi adicionado cada mistura, 1 volume de etanolamina 50 mM pH 8,0 para saturar os grupos reativos remanescentes na agarose. Na sequência, as matrizes imobilizadas foram centrifugadas por 5 minutos a 2000 x g, a temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram removidos e alíquotas coletadas para a leitura da absorbância a 280 nm. Essa leitura serviu para determinar o percentual de imobilização das rFrutalina nas matrizes ativadas, através da comparação com as absorbâncias das soluções lectínicas iniciais. Após o processo de imobilização, as matrizes (10 mL) foram empacotadas em suportes cromatográficos adequados (*BioRad*[®]), lavadas com 5 volumes do tampão de equilíbrio (PBS pH 7,4 filtrado e desaerado) e mantidas na geladeira até a utilização.

4.14 Processamento do colostro humano

Após as coletas, o colostro foi homogeneizado e centrifugado a 15000 rpm, por 15 minutos a 4 °C. Em cabine de fluxo laminar, a fase intermediária (soro) foi coletada e transferida para um tubo Falcon estéril (50 mL), desprezando-se a gordura e sedimentos celulares. Em seguida, soro foi esterilizado em filtro de 0,22 µm e alíquotado em microtubos de 2 mL, que foram identificados e estocados a -80 °C para uso posterior.

4.15 Determinação da IgA total

A determinação do IgA total do colostro foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) quantitativo. Foram pipetados 100 µL do anticorpo de

captura anti-IgA purificado (Sigma, EUA), na concentração de 5 µg/mL, em cada poço da placa- de 96 poços, que foi posteriormente coberta com filme plástico, deixada em câmara úmida durante 16 horas a 4 °C e, em seguida, lavada por quatro vezes com tampão de lavagem: tampão PBS pH 7,4 contendo 0,1% de Tween 20. As amostras e controles foram diluídos em tampão PBS com NaCl 350 mM contendo 0,2% de Tween 20. Como padrão, foi utilizado IgA secretora humana (Sigma, EUA), na concentração de 1 a 6 µg/mL. Foram pipetados 100 µL do padrão e do soro do colostro nos poços. A placa foi incubada por 2 horas a 37 °C e posteriormente lavada por três vezes com tampão de lavagem, após foi acrescentado 100 µL em cada poço do conjugado anti-IgA, marcado com peroxidase (Sigma, EUA), 1:5000, no tampão de diluição das amostras. A placa foi incubada por uma hora e 30 minutos a 37°C. A placa foi novamente lavada por três vezes com tampão de lavagem, e após foram colocados em cada poço 100 µL do substrato (tampão citrato-fosfato 100mM, pH 5,0; H₂O₂ a 30%; e OPD (ortofenilenodiamina – Sigma, EUA) foi adicionado para revelar a reação. A placa foi incubada no escuro em temperatura ambiente, por 30 minutos. Para o bloqueio da revelação, adicionou-se 50 µL de H₂SO₄, 2,5N em cada poço. A leitura da placa, foi realizada em leitor de ELISA (ELx-800 *BioTek Instruments*), no comprimento de onda de 492 nm. As concentrações de IgA total das amostras de colostro foram determinadas a partir dos valores da curva padrão de IgA humana realizada a cada ensaio e expressas em mg/mL. A curva padrão foi feita com base na leitura da absorbância a 492 nm da amostra de IgA comercial, com concentrações conhecidas.

4.16 Precipitação de proteínas do colostro

O soro obtido conforme descrito no item 14 foi submetido ao processo de precipitação de proteínas com sulfato de amônio com 60% de saturação. Em seguida, os precipitados proteicos foram obtidos por centrifugação (13000 rpm por 15 minutos, a 4 °C), ressuspensos no tampão PBS pH 7,4 e dialisados contra o mesmo tampão. Essas amostras foram utilizadas para o isolamento da IgA1.

4.17 Purificação de IgA1 de colostro humano utilizando matrizes de agarose imobilizadas com a rFrutalina.

Cada coluna, padronizada para o volume de 10 mL de matriz, foi primeiramente equilibrada com PBS pH 7,4. Esse mesmo tampão foi utilizado para eluir as proteínas não ligantes. A IgA1 retida na matriz imobilizada com a frutalina, foi eluída com D-galactose 100 mM em PBS. As frações de interesse (aquelas eluídas da coluna agarose-rFrutalina) foram agrupadas e posteriormente dialisadas e concentradas por dialofiltração. Esta mistura foi denominada como Fr_{IgA1} (fração rica IgA1). A concentração proteica das frações foi monitorada pela leitura da absorbância a 280 nm em espectrofotômetro. A pureza da fração Fr_{IgA1} foi avaliada por PAGE-SDS (15%) e por ensaios de imunodeteção (*Western blot*). O custo, o rendimento e a eficiência das matrizes agarose-frutalina foram comparados aos da matriz comercial utilizada para o mesmo fim. Nessa matriz, a densidade do ligante imobilizado é de 4 mg lectina/mL de gel e sua capacidade de ligação é de 2 mg de IgA humana/mL de gel.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

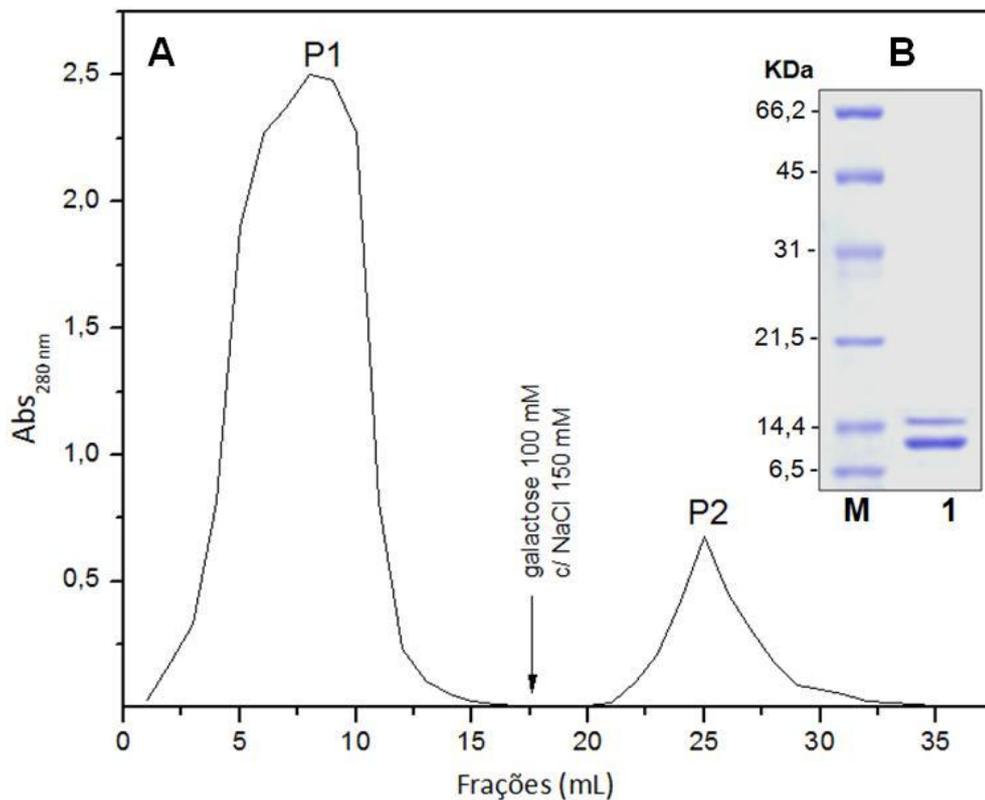
5.1 Purificação da frutalina nativa e da rFrutalina e caracterização biofísica da rFrutalina

Após os processos de remoção dos frutos, limpeza, delipidação e trituração das sementes de *A. incisa*, o rendimento da farinha produzida foi de $92,8 \pm 0,6$ g por 100 g de sementes. O rendimento proteico do extrato total (Et) obtido a partir da farinha de sementes, apresentou um conteúdo de $4,7 \pm 0,5$ mg/g da farinha. Segundo Moreira *et al.* (1998), as sementes de *A. incisa* apresentam um alto teor de carboidratos (76,8%) e teores mais baixos de proteínas e lipídios (12,3 e 4,9%, respectivamente). A frutalina nativa foi eficientemente purificada em coluna de agarose-D-galactose (Figura 5A), apresentando 2 bandas proteicas com massas moleculares aparente de 15 e 12 kDa, quando analisada por PAGE-SDS sob condições redutoras (Figuras 5B). No entanto, apresentou um baixo rendimento de purificação (5 μ g/mL de extrato). Isso mostra que a purificação da frutalina nativa (ou seja, diretamente das sementes) pode apresentar uma série de desvantagens, além dos rendimentos relativamente baixos, tais como tempo longo do processo e a presença de isoformas naturais.

A rFrutalina foi expressa em *P. pastoris* como uma proteína de cadeia única, uma vez que o linker de quatro aminoácidos (T-SS-N), que liga as cadeias α e β , não foi clivado. No processamento pós-traducional da frutalina nativa, este linker é removido para separar as cadeias α e β , formando uma proteína tetramérica na qual cada monómero é constituído por uma cadeia α e uma cadeia β unidas por ligações não covalentes.

Sahasrabuddhe *et al.* (2004) e Oliveira *et al.*, (2008), relataram que a clivagem do ligante (T-SS-N) em lectinas relacionadas a jacalina, pode ser necessária para melhorar a afinidade da ligação a galactose, mas estudos demonstram a sua utilização como potenciais marcadores de células neoplásicas, visto que o padrão de glicosilação das células malignas são diferentes das benignas, confirmando sua atividade (OLIVEIRA *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2011; MENDONÇA, 2013).

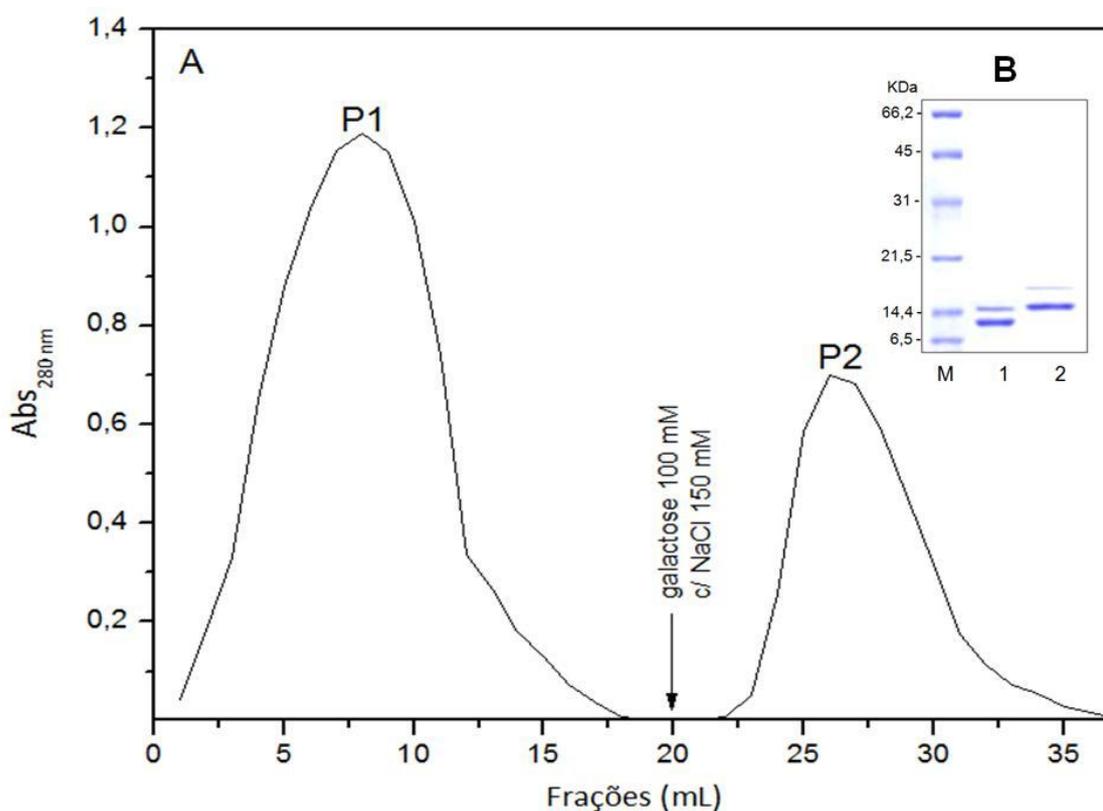
Figura 5 Purificação da frutalina nativa e análise eletroforética. (A) Cromatografia de afinidade em coluna de agarose-D-galactose: a coluna foi equilibrada e a fração não-retida (P1) foi eluída com NaCl 0,15 M. A cromatografia foi realizada numa coluna de 10 mL, utilizando um fluxo de 1 mL/min e coletando frações de 0,5 mL. A fração retida (P2) foi eluída com uma solução galactose 100 mM com NaCl 150 mM. **(B)** PAGE-SDS 15%, sob condição redutora. da fração purificada: M – marcadores moleculares: Albumina (66,2 kDa); Ovalbumina (45,0 kDa); Anidrase carbônica (31,0 kDa); Inibidor de tripsina (21,5 kDa) e Lactalbumina (14,4 kDa).; 1 – frutalina nativa



Fonte: Autor, (2016)

A figura 6 mostra os resultados do processo de purificação da frutalina recombinante (rFrutalina) por cromatografia de afinidade, também em coluna de agarose-D-galactose. Como pode ser observado, essa matriz também mostrou-se bastante eficiente na purificação da proteína heteróloga, que apresentou um rendimento bem superior (20 µg/mL) ao da frutalina nativa.

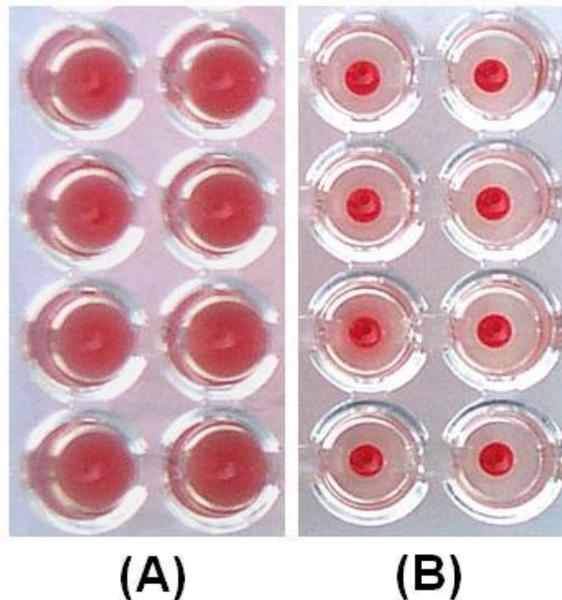
Figura 6. Purificação da rFrutalina e análise eletroforética. (A) Cromatografia de afinidade em coluna de agarose-D-galactose: a coluna foi equilibrada e a fração não-retida (P1) foi eluída com NaCl 0,15 M. A cromatografia foi realizada numa coluna de 10 mL, utilizando um fluxo de 1 mL/min e coletando frações de 0,5 mL. A fração retida (P2) foi eluída com galactose 100 mM com NaCl 150 mM. **(B)** PAGE-SDS 15% da fração purificada sob condição redutora: M – marcadores moleculares: Albumina (66,2 kDa); Ovalbumina (45,0 kDa); Anidrase carbônica (31,0 kDa); Inibidor de tripsina (21,5 kDa) e Lactalbumina (14,4 kDa); 1 – frutalina nativa e 2 – Fração do P2 (referente a rFrutalina).



Fonte: Autor, (2016)

As frações obtidas da rFrutalina apresentaram uma forte capacidade de aglutinação ($256 \text{ UH} \cdot \text{mL}^{-1}$) em sangue não tratado de coelho (Figura 7A). Para certificar que essa atividade era realmente de origem proteica, outra alíquota da rFrutalina foi submetida ao tratamento térmico de $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 minutos em banho seco e utilizada no ensaio de hemaglutinação, sob as mesmas condições anteriormente testadas. Nenhuma aglutinação foi observada com amostra aquecida (Figura 7B), confirmando que atividade hemaglutinante era de origem proteica.

Figura 7. Ensaio de atividade hemaglutinante da rFrutalina utilizando hemácias de coelho.(A) sem tratamento térmico e (B) com aquecimento a 100 °C por 5 minutos.



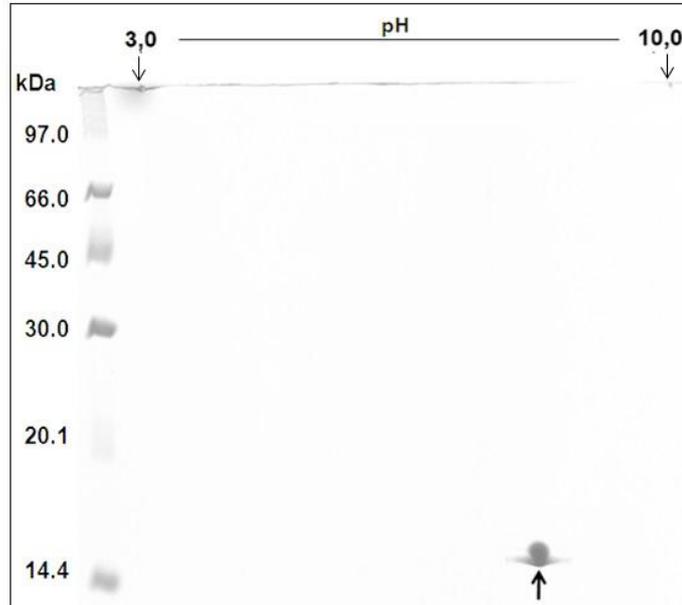
Fonte: Autor, (2016)

A figura 8A mostra eletroforese bidimensional da rFrutalina. Após análise do gel utilizando o software *ImageMaster 2D Platinum 6.0*, apenas um *spot* foi observado, significando a ausência de isoformas na fração da rFrutalina. Já Moreira et al. (1997), apontaram a existência de isoformas da frutalia nativas, com pIs na faixa de 8,8 a 9,0. Estas isoformas podem ter diferentes propriedades físico-químicas levando a uma indesejável variabilidade de resultados relacionados as suas atividades biológicas. A rFrutalina detectada no gel foi validada após análise tridimensional individualizada (Figura 8B) utilizando ferramenta específica do programa. Os vales estimados de ponto isoelétrico foi de 8,7 e a massa molecular foi de 15.632 Da.

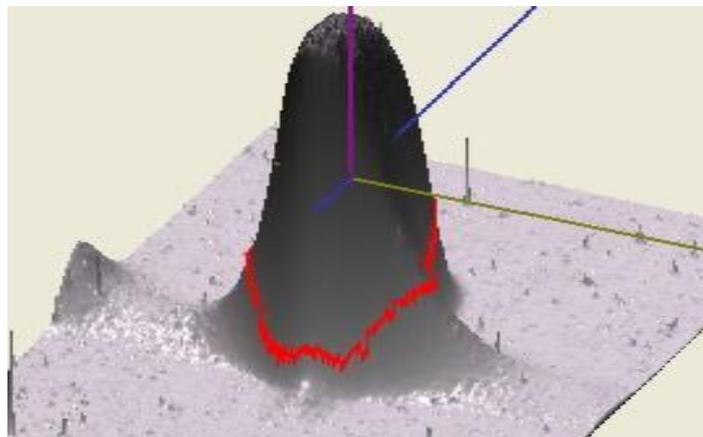
Figura 8. Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (12,5%) da rFrutalina (A). Neste ensaio foi utilizado uma tira de 11 centímetros de pH imobilizado variando de 3 a 10. A setas indica a presença de uma única proteína, detectada após análise utilizando o programa *ImageMaster 2D Platinum 6.0*. Marcadores de massa molecular: Albumina (66,2 kDa); Ovalbumina (45,0 kDa);

Anidrase carbônica (31.0 kDa); Inibidor de tripsina (21,5 kDa) e Lactalbumina (14. 4 kDa). **(B)** Imagem 3D da proteína detectada no gel.

(A)



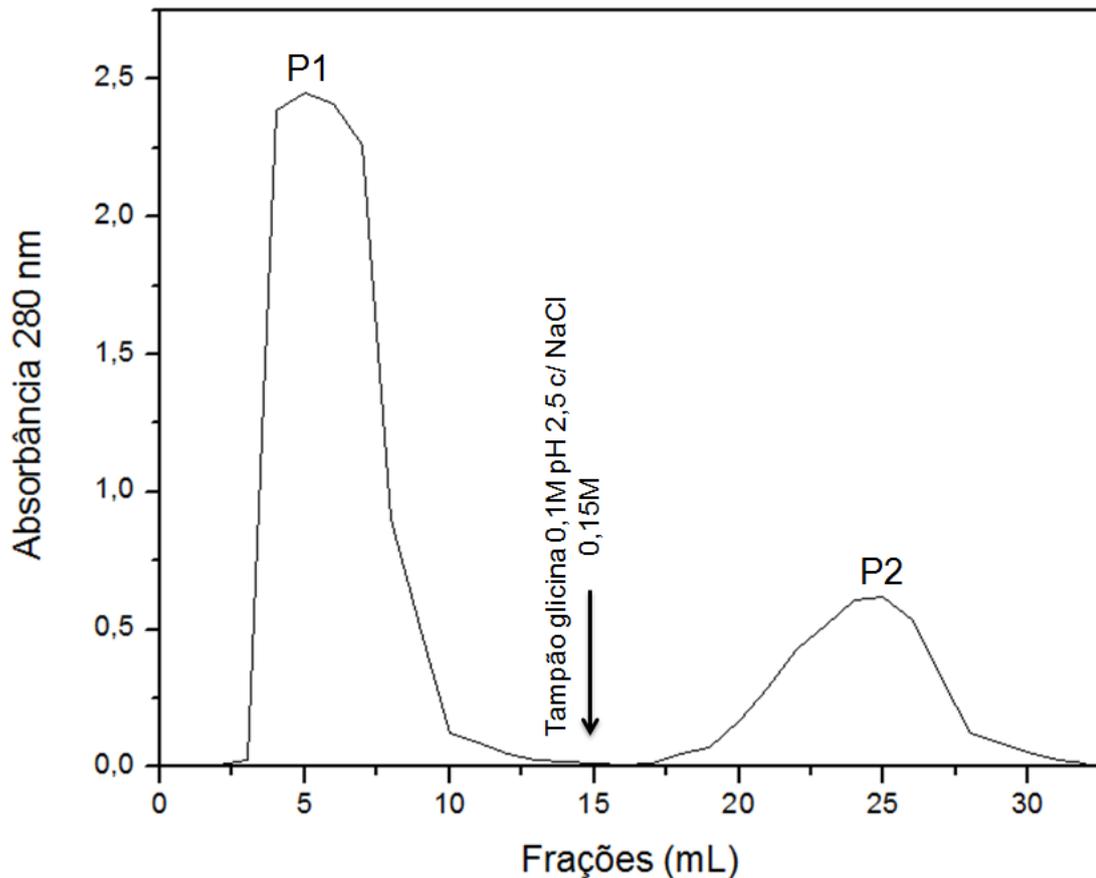
(B)



Fonte: Autor, (2016)

A fração proteica do soro obtido do coelho imunizado com a frutalina nativa foi purificada em coluna de Sepharose-proteína A para ser utilizada nos ensaios de imunodeteção (via Western blot) e imunoafinidade. Durante a purificação foram obtidos dois picos cromatográficos: o pico 1 referente as proteínas do plasma que não interagiram com a matriz e o pico 2, referente a fração rica em IgG (correspondente a fração anti-frutalina) que interagiu com a matriz e foi eluída por redução do pH.

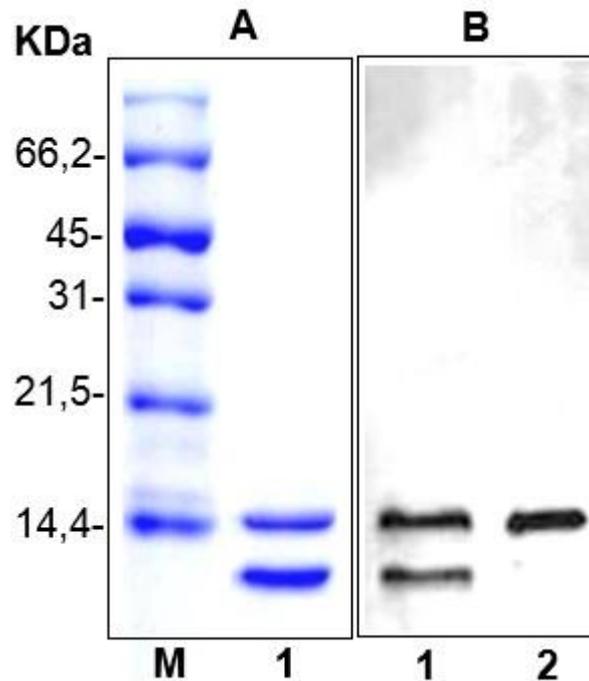
Figura 9. Purificação do anticorpo policlonal anti-frutalina por cromatografia de afinidade em Sepharose-Proteína A. A coluna foi equilibrada e a fração não-retida (P1) foi eluída com o tampão PBS pH 7,4. A cromatografia foi realizada numa coluna de 15 mL, utilizando um fluxo de 0,5 mL/min e coletando frações de 1 mL. A fração retida (P2) foi eluída com o tampão glicina 0,1 M pH 2,5 contendo NaCl 150 mM.



Fonte: Autor, (2016)

A fração rica em IgG foi diluída (1:100 v/v) e testada no ensaio de *Western blot* que confirmou a sua reatividade com as bandas proteicas da frutalina nativa e da rFrutalina, devido a forte interação com o anticorpo policlonal anti-frutalina (Figura 10).

Figura 10 – Imunodeteccção da frutalina e da rFrutalina utilizando o anticorpo anti-frutalina produzido no LabBMol.(A)SDS-PAGE 12,5 %:M – Marcadores moleculares; 1 –Frutalina nativa sob condição redutora. (B)*Western blot*: 1-Frutalina nativa; 2- rFrutalina.

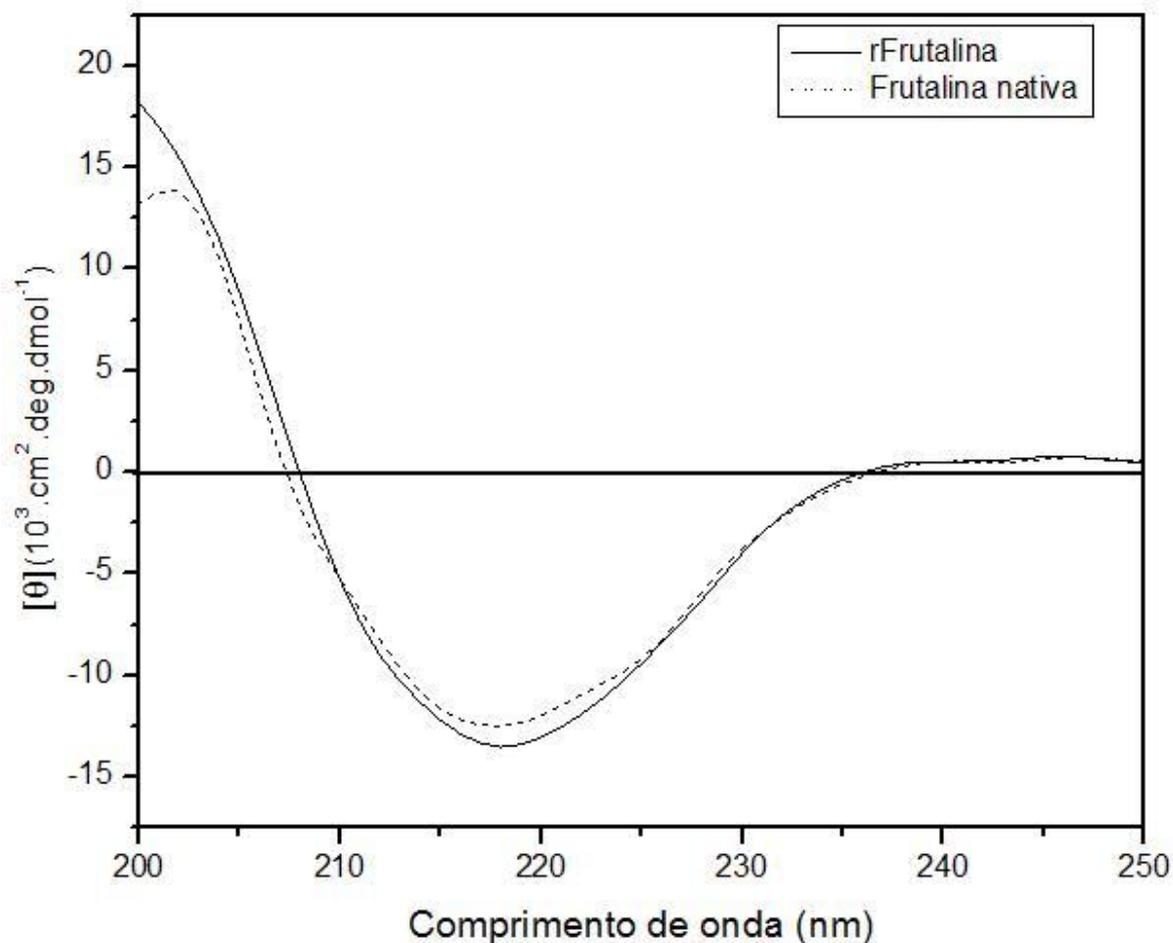


Fonte: Autor, (2016)

Como resultados das análises de CD, os espectros de dicroísmo circular da rFrutalina apresentaram um mínimo negativo em 218 (Figura 11), perfil similar ao da frutalina nativa alcançado por Moreira *et al* (1997). Este espectro concorda com a predominância de estruturas do tipo folhas- β (KELLY e PRICE, 1997; WOODY, 1994). O perfil dos espectros de CD da rFrutalina também são muito semelhantes ao da jacalina, uma lectina presente em sementes de *Artocarpus integrifolia*, bem como ao da jacalina recombinante (SAHASRABUDDHE *et al.*, 2004)

Figura 11. Espectros de dicroísmo circular da frutalina nativa e da rFrutalina.

As medidas foram realizadas com soluções protéicas de aproximadamente 20 μg da proteína em tampão PBS pH 7,4. Os espectros foram obtidos variando o comprimento de onda entre 200 a 250 nm e registrados com uma média de 16 varreduras, a temperatura ambiente (25 °C), utilizando cubeta retangular de caminho óptico de 1 mm.



Fonte: Autor, (2016)

As análises quantitativas do espectro de CD da rFrutalina confirmaram a predominância de folhas- β (Tabela 1). É interessante notar que a frutalina recombinante exibe um padrão de estrutura secundária similar ao da frutalina nativa. A partir destas observações, é razoável concluir que a rFrutalina é idêntica à frutalina em relação a estrutura secundária.

Tabela 1. Predição da estrutura secundária da rFrutalina utilizando os programas CONTIN e SELCON 3.

Estrutura secundária	rFrutalina (%) ^a	Frutalina (%) ^b
α -hélices	0	0
Folhas- β antiparalelas	65	64
Folhas- β paralelas/ voltas	20	21
Não ordenadas	5	6
Outras contribuições	10	9

^a Raiz média quadrática (r.m.s) de 1%

^b Dados obtidos de Moreira et al., 1997.

Fonte: Autor, (2016)

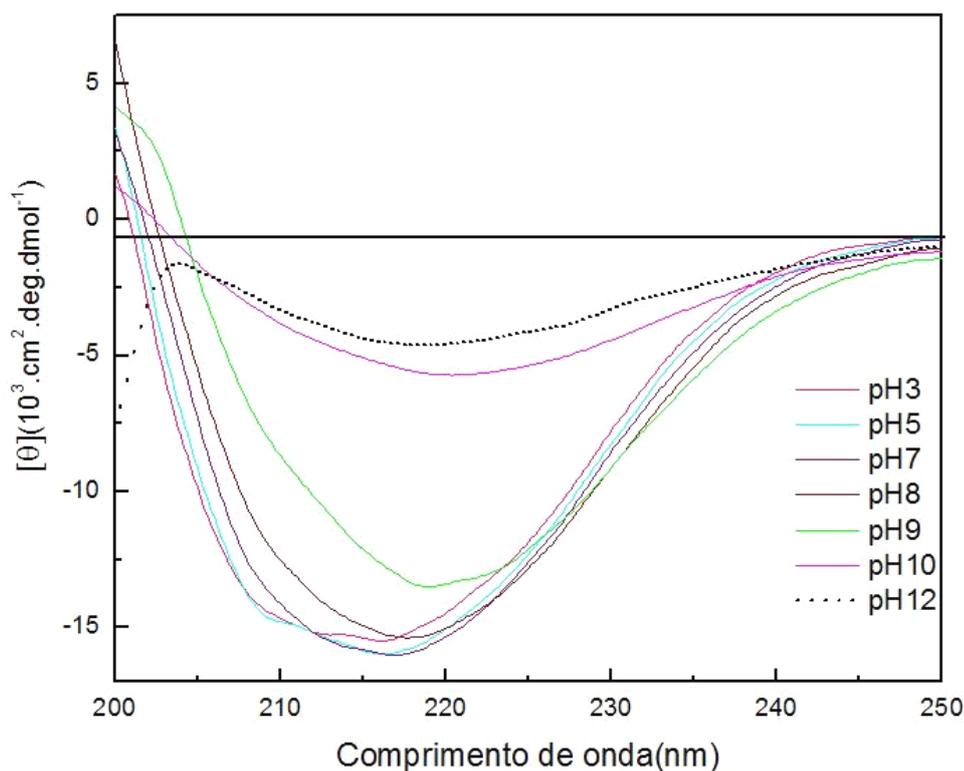
A figura 12 mostra os espectros de CD da rFrutalina em diferentes valores de pH. Significativas alterações na estrutura secundária foram observadas em valores de pH acima de 9. Em pH 12, a rFrutalina apresentou um espectro com perfil característico de desordenamento estrutural, representando que nesta condição a proteína está desnaturada. No entanto, devido as pequenas modificações observadas nos espectros de CD na faixa de pH de 3 a 8, isso mostra que a rFrutalina apresenta uma boa estabilidade conformacional, principalmente em condições ácidas. discutir esse resultado comparando a estrutura da proteína nativa

Segundo Gaikwadand Khan, (2003), a diminuição da afinidade de ligação de sacarídeos a lectina de *A. hirsuta* em pH ácido pode ser devido a pequenas alterações conformacionais no domínio de reconhecimento a carboidratos, devido a elevadas cargas positivas presentes na proteína nessa faixa de pH. A ausência de ligação ao açúcar na faixa de pH 10-12 pode ser devido a desnaturação da lectina. Assim, a lectina de *A. Hirsuta* foi mais estável na faixa de pH neutro e ácido do que no pH alcalino.

O elevado teor de cisteínas conservadas em lectinas do gênero *Artocarpus* esta diretamente relacionado a formação de pontes dissulfeto intercadeias, garantindo a proteína rigidez e estabilidade através de uma ampla faixa de pH e temperatura (Harata and Muraki, 2000; Hayashida et al., 2003; Asensio et al., 2000).

Figura 12. Espectros de dicroísmo circular da rFrutalina em diferentes valores de pH. As medidas foram realizadas utilizando alíquotas de 100 μ L de solução

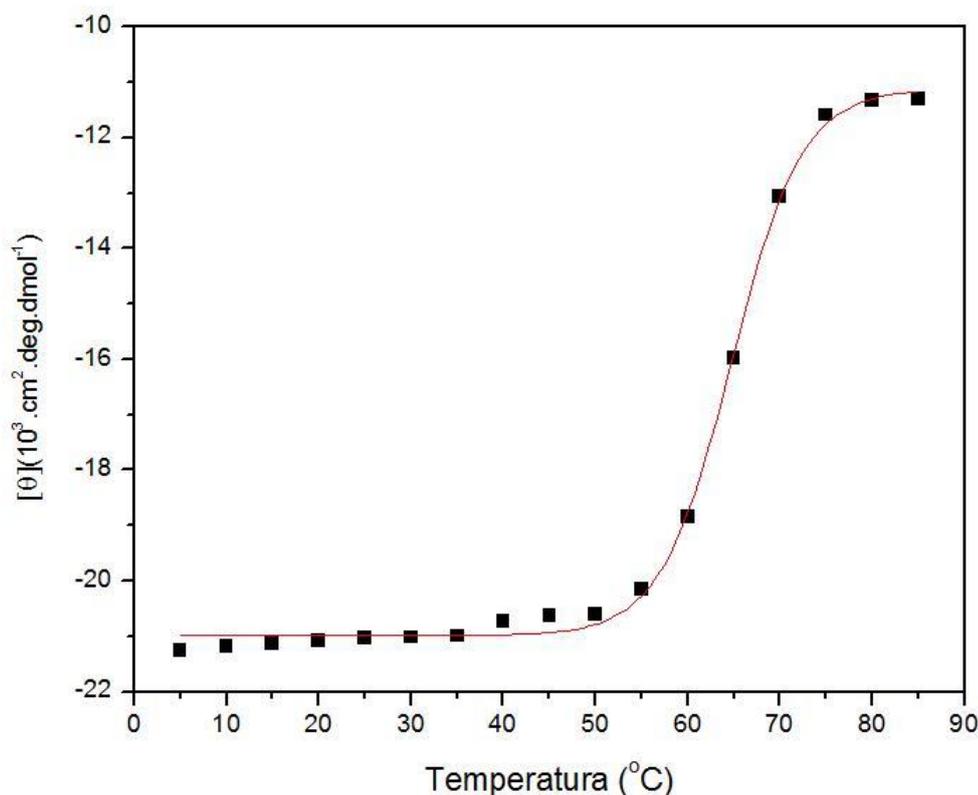
proteica (contendo 20 μg da rFrutalina) em tampão acetato-fosfato-borato 20 mM ajustado para diferentes valores de pH. Foram realizadas varreduras de 200 a 250 nm aplicando a velocidade de 50 nm/min, registrando uma média 8 acumulações. As medidas foram realizadas a 25 °C, utilizando cubeta retangular de caminho óptico de 1 mm,



Fonte: Autor, (2016)

O CD também foi usado para avaliar as mudanças conformacionais provocadas pelo calor na estrutura secundária da rFrutalina. Como resultado, foi constatado que a frutalina manteve sua estrutura praticamente estável até 55 °C, padrão já relatado por Campana *et al* (2001) (Figura 13). No entanto, mudanças significativas foram observadas a partir de 60°C, na qual também foi observada a descaracterização do espectro de CD, sugerindo a perda de estrutura secundária e consequentemente a desnaturação da proteína. Resultados semelhantes foram obtidos para as jacalinas nativa e recombinante, que mostraram-se estáveis até a temperatura de 50°C, apresentando um padrão de desenovelamento em temperaturas acima de 55 °C (WANG e LIU, 2003).

Figura 13. Curva de termoestabilidade da estrutura secundária obtida dos espectros de dicroísmo circular da rFrutalina.



Fonte: Autor, (2016)

O ensaio de termoestabilidade da rFrutalina também demonstrou que a proteína apresenta uma temperatura de transição (T_m – *Temperature melting*) do estado nativo para o desnaturado em torno de 65 °C.

A técnica de fluorescência foi utilizada para avaliar o efeito do pH na estabilidade da estrutura terciária da rFrutalina, já que a presença de dois triptofanos na estrutura da proteína pode viabilizar o monitoramento de possíveis mudanças conformacionais. Essa técnica baseia-se na propriedade que algumas moléculas possuem de emitirem luz em comprimentos de onda mais longos. No caso das proteínas, três resíduos de aminoácidos apresentam esta propriedade: a tirosina, o triptofano e a fenilalanina (LACKOWICZ, 1983). Esses resíduos são denominados fluoróforos naturais e sua fluorescência é altamente específica e sensível ao ambiente em que se encontram. Sendo assim, a fluorescência de uma proteína quando devidamente enovelada é resultante da fluorescência de seus resíduos individuais, dependendo da vizinhança de cada um deles. Esse fato aliado à

facilidade de realizar medidas com amostras pouco concentradas (na ordem de 10^{-6} M para proteínas), torna a fluorescência uma técnica bastante sensível e eficaz para monitorar mudanças conformacionais e interações com ligantes (LACKOWICZ, 1992). Como resultado dessa análise, foi observado que em pH neutro, o espectro de emissão da rFrutalina é caracterizado por um máximo de emissão em 338 nm típico de resíduos de triptofano que se encontram em regiões da molécula mais expostas ao solvente. Também foram observadas pequenas alterações no comprimento de onda de emissão máxima da rFrutalina na faixa de pH 3 a 7, o que representa que não ocorreram alterações conformacionais significativas nas vizinhas dos resíduos de triptofano nestas condições (Figura 14). Em pH 9, nota-se uma pequena redução da emissão de fluorescência, significando que neste pH a proteína começa a sofrer alterações conformacionais. Já em pH 12, além de uma significativa supressão da fluorescência (de aproximadamente 54 %) também ocorreu o deslocamento do máximo de emissão para 365 nm (referente a região do vermelho). Esse deslocamento indica a ocorrência de alterações no microambiente químico da (s) região (ões) onde os resíduos de triptofano estão presentes, o que representa que houve uma maior exposição dessa (s) região (ões) ao solvente e conseqüentemente, o desenovelamento da rFrutalina em pH 12.

Gaikwadand Khan, (2003) avaliaram a atividade dependente de pH, agregação e estrutura secundária da lectina de *Artocarpus hirsuta* usando os métodos de fluorescência intrínseca e extrínseca, DLS e dicroísmo circular. A lectina ligante de α -galactosídeos de *A. hirsuta* mostrou-se estável numa ampla faixa de pH a 30° C. O espectro de fluorescência mostrou o estado de desnaturação da lectina numa faixa de pH alcalino. O espectro de CD da lectina de *A. hirsuta* mostrou sua estrutura secundária intacta numa faixa de pH 1-8 e um estado de desordem estrutural da lectina acima de pH 9.

Gaikwad et al. (2002), monitoraram as transições conformacionais da lectina de *A. hirsuta* por fluorescência intrínseca e dicroísmo circular. O espectro de emissão de fluorescência da lectina nativa mostrou uma emissão máxima a 335 nm, o que caracteriza um ambiente não polar dos resíduos de triptofano. Os autores observaram ainda uma desnaturação da lectina com o aumento da concentração de GdnHCl (cloridrato de guanidina), indicando que devido o desdobramento da proteína a maior parte dos seus resíduos de triptofano ficam expostos ao solvente.

Tendências de desnaturação semelhantes ao GdnHCl foram observadas numa faixa de pH 5-8, e mais intensas em faixas de pH 4-9. O espectro de CD mostrou a seguinte percentagem relativa de elementos estruturais: 2% α -hélices, 44% β -folha, 23% voltas e 30% enrolamento aleatório.

Os dados de Fluorescência e CD obtidos para a lectina nativa de *A hirsuta* confirmam um padrão de estruturas secundárias para lectinas do gênero *Artocarpus*, além de corroborar com os resultados obtidos para rFrutalina, onde ambas as proteínas demonstram uma estabilidade conformacional em ambiente ácido e neutro e uma desordem estrutural, seguida de desnaturação proteica em ambientes com faixa de pH alcalino.

Sahasrabudde et al. (2004), caracterizaram por fluorescência intrínseca a cadeia simples da jacalina recombinante. Os autores observaram que a estabilidade de rJacalina é drasticamente reduzida nas faixas de pH extremo ao contrário nJacalina.

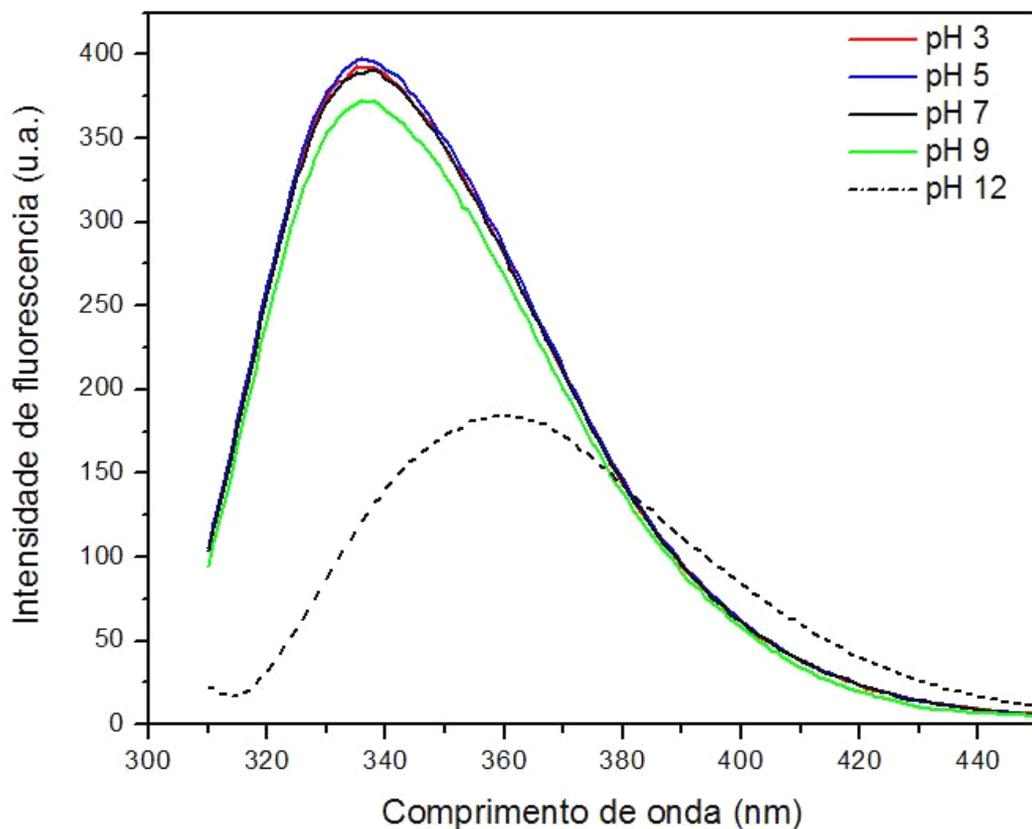
A espectroscopia de fluorescência também foi utilizada para monitorar o microambiente do triptofano em função da interação da rFrutalina e seu açúcar ligante, a D-galactose. Para minimizar o efeito do espalhamento de luz pelo tampão, o espectro de cada amostra foi subtraído do espectro do tampão com a D-galactose. Foi observado que, na presença do açúcar, ocorre uma redução na intensidade de fluorescência (Figura 15). Esses resultados sugerem a presença de triptofano próximo ao sítio de ligação da rFrutalin e que redução da intensidade de fluorescência pode ser um indício de que esse resíduo esteja deslocado mais para o interior desse sítio. Uma vez ligada a proteína, a D-galactose ocasionaria uma redução da emissão da fluorescência devido a sobreposição do triptofano presente no sítio de ligação.

Sultan et al. (2009), utilizaram a técnica de redução da fluorescência para monitorar a acessibilidade e a exposição dos resíduos de Trp da lectina ligante de galactose isolada das sementes de *Trichosanthes cordata* (TCA-1) e a sua ligação com a lactose. Foram observadas alterações no sinal da fluorescência intrínseca pelo ligante específico da lectina. Estes ensaios indicaram que os resíduos de Trp de TCA-1 estão principalmente enterrados no núcleo hidrofóbico da proteína dobrada.

Sahasrabudde et al. (2004), avaliaram a acessibilidade e exposição dos resíduos de triptofano da nJacalina e rJacalina por redução de fluorescência. Foi

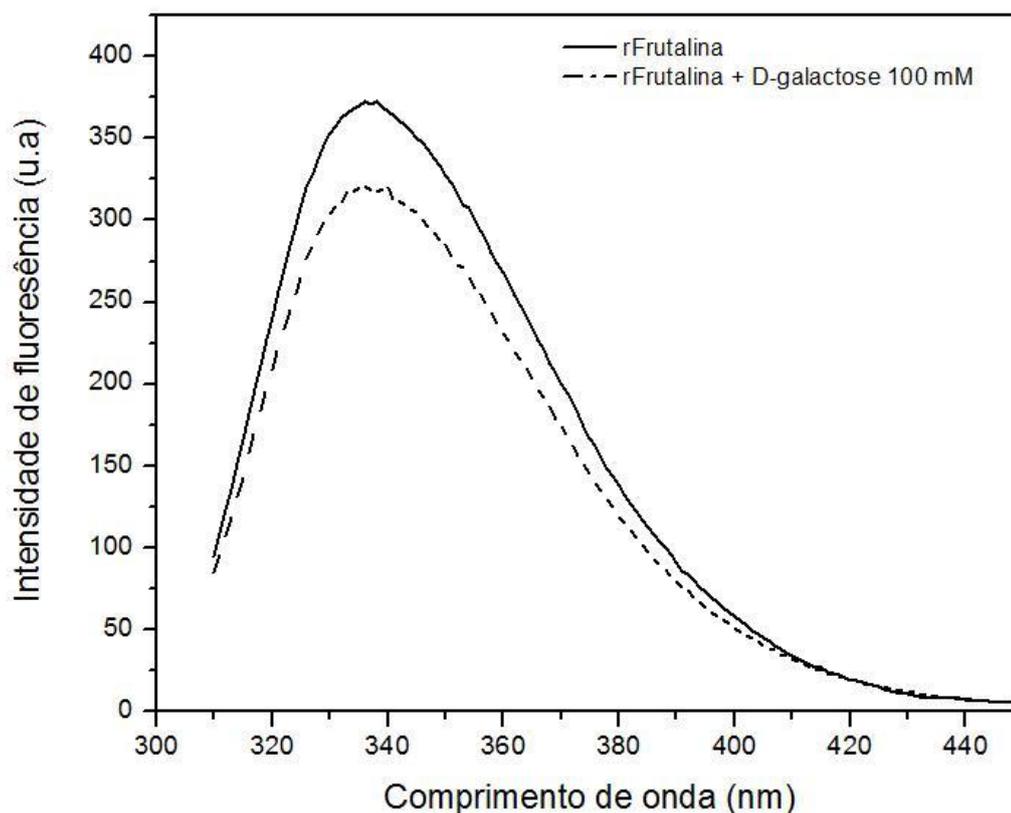
observado no estudo que o microambiente dos resíduos de triptofano, indicam que a maior desses resíduos estão provavelmente enterrados dentro da região do núcleo das proteínas e são acessíveis apenas para redução neutra em ambas nJacalina e rJacalina.

Figura 14. Espectro de emissão de fluorescência da rFrutalina em diferentes valores de pH. Aliquotas da proteína ($60 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em tampão acetato-fosfato-borato 20 mM ajustado para diferentes valores de pH (3, 5, 7, 9 e 12) foram excitadas em 295 nm e a emissão foi monitorada no intervalo de 300 a 450 nm, usando cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico.



Fonte: Autor, (2016)

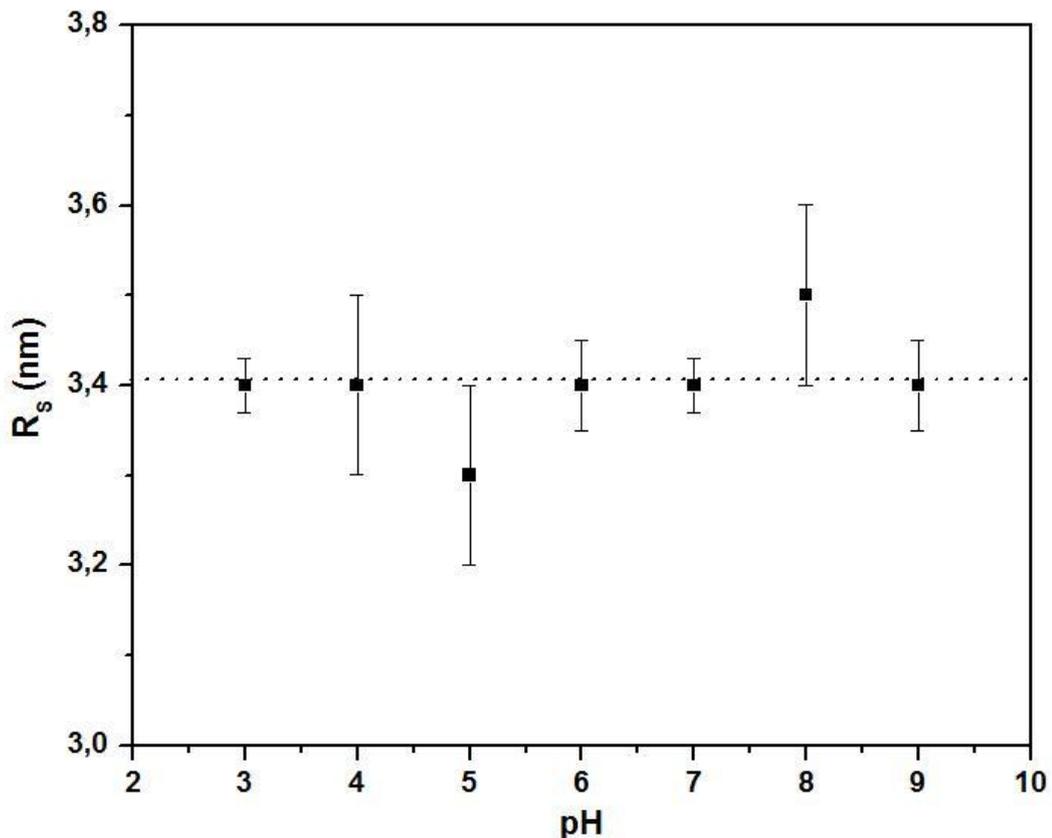
Figura 15. Espectro de emissão de fluorescência da rFrutalina na presença de D-galactose. Alíquotas da proteína ($60 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) em tampão PBS pH 7,4 com e sem D-galactose 100 mM foram excitadas em 295 nm e a emissão foi monitorada no intervalo de 300 a 450 nm, usando cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico.



Fonte: Autor, (2016)

O método de espalhamento dinâmico de luz(DLS) foi utilizado para confirmar o estado oligomérico da frutalina recombinante em solução (REF). Os resultados mostraram que a oligomerização da rFrutalina não muda com a variação de pH (Figura 16). O valor médio de raio hidrodinâmico (R_s) de $3,4 \pm 0,1$ nM, o que corresponde a uma massa molecular de 59 ± 4 KDa. Este resultado é consistente com o obtido Oliveira et al. (2008), que sugeriram que a rFrutalina apresenta uma estrutura tetramérica, com massa molecular estimada por exclusão molecular correspondendo a 62-64 KDa

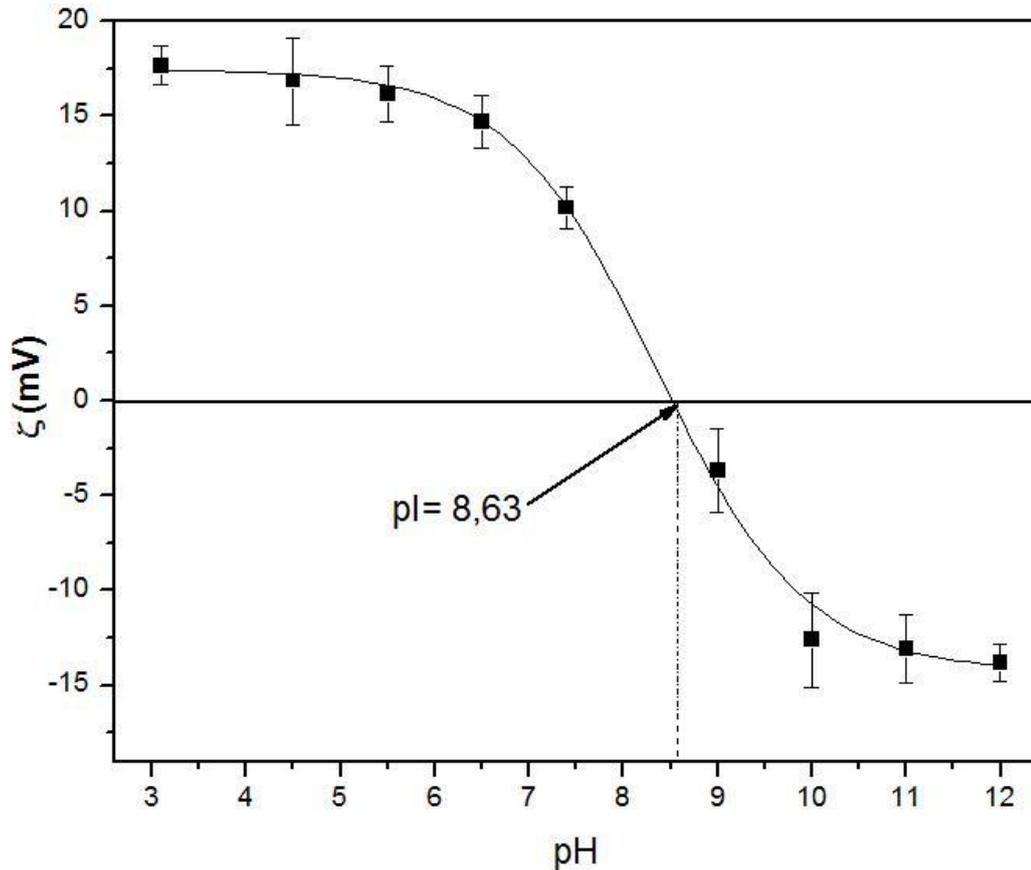
Figura 16. Caracterização da rFrutalina por espalhamento dinâmico de luz (DLS) em função do pH. Foram usadas alíquotas da rFrutalina (1 mg.mL^{-1}), em tampão de acetato-fosfato-broato 20 mM ajustado para diferentes valores de pH (3-10). As medidas foram realizadas no sistema Nano-ZS, que utiliza um laser de 633 nm e um ângulo de dispersão fixo (173°).



Fonte: Autor, (2016)

A fim de compreender a influência do pH sobre a carga líquida, o potencial zeta da rFrutalina foi determinada como uma função do pH (Figura 17). O potencial zeta diminuiu de $17,6 \pm 0,8 \text{ mV}$ (em pH 3) para $-13,8 \pm 1,1 \text{ mV}$ (em pH 12). O ponto isoelétrico (pI) foi alcançado a um pH de 8,6, condição na qual o valor do potencial zeta foi zero. O valor obtido (pI 8,63) é consistente com o valor de pI (8,7) calculada a partir da sequência de aminoácidos da rFrutalina.

Figura 17. Potencial zeta da rFrutalina em função do pH. As medidas foram realizadas a 25 °C, utilizando uma concentração protéica de 1 mg.mL⁻¹ em tampão de acetato-fosfato-borato 20 mM ajustado para diferentes valores de pH (3-12).



Fonte: Autor, (2016)

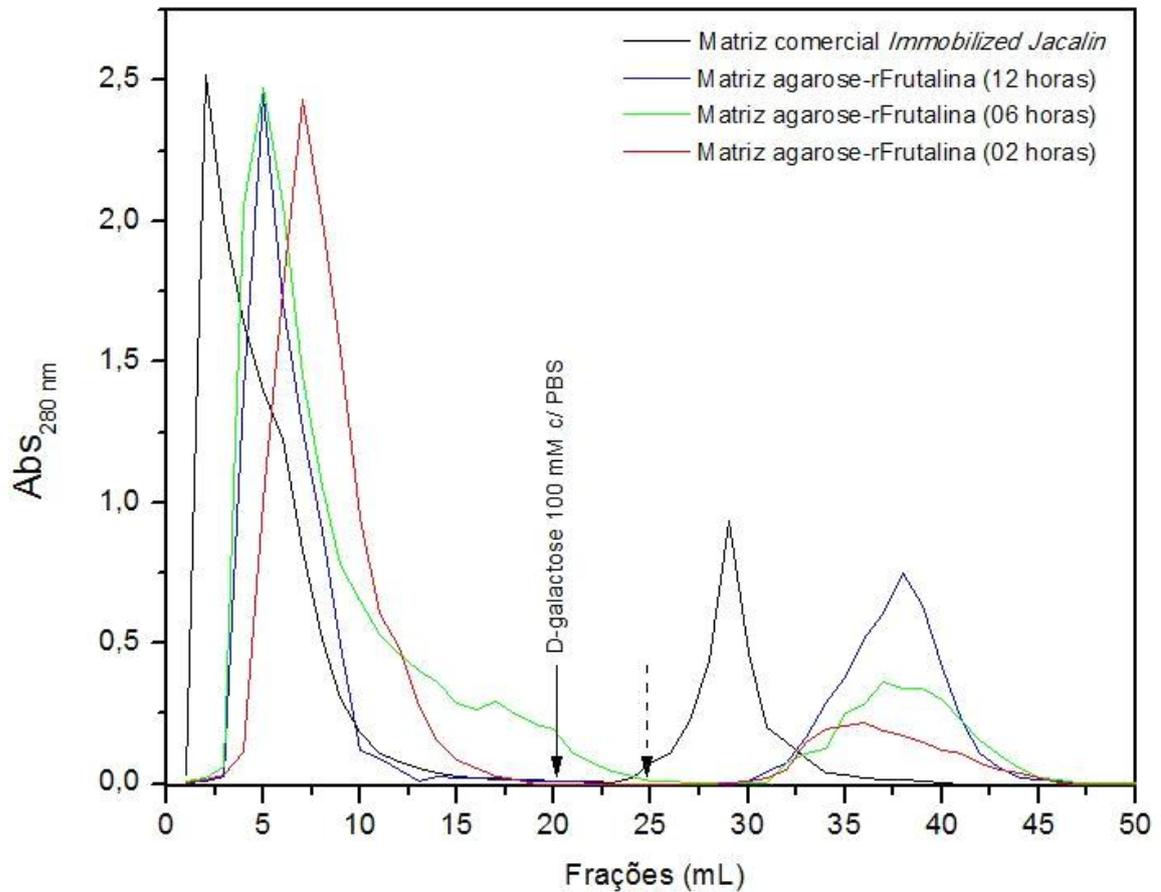
5.2 Produção da matriz agarose-rFrutalina

Após as coletas, colostro humano foi homogeneizado e submetido a quantificação do IgA total por ensaio imunoenzimático (ELISA) quantitativo. Os resultados mostraram que as amostras coletadas apresentaram uma concentração de IgA total de 11,5 mg.mL⁻¹ de colostro. Esse valor foi próximo ao valor citado por Kerr (1990) para o colostro humano, correspondente a 12,3 mg.mL⁻¹ de colostro.

A figura 18 mostra os resultados obtidos das purificações de IgA utilizando matrizes de agarose imobilizada com a rFrutalina por 2, 6 e 12 horas. A matriz comercial *Immobilized Jacalin*® foi utilizada na cromatografia controle.

Figura 18. Purificação da IgA₁ de colostro humano por cromatografia de afinidade em colunas de agarose-rFrutalina e *Immobilized Jacalin*®. As colunas

foram equilibradas com tampão PBS pH 7,4 e as frações não-retidas foram eluídas com o mesmo tampão. As cromatografias foram realizadas colunas de 10 mL, utilizando um fluxo de 0,5 mL/min e coletando frações de 0,5 mL. As frações retidas (ricas em IgA₁) foram eluídas com D-galactose 100mM contendo PBS. A seta pontilhada indica o início da eluição das frações retidas nas matrizes agarose-rFrutalina.

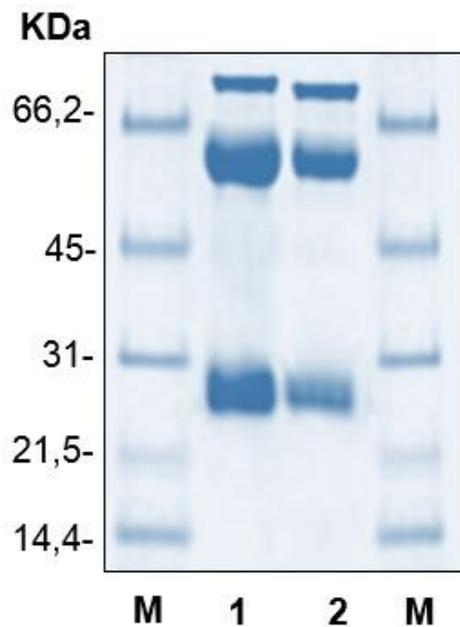


Foi observado que as matrizes agarose-rFrutalina, assim como a matriz comercial, foram capazes de reter uma fração rica em IgA₁ (Fr_{IgA1}). Todas as matrizes testadas apresentaram dois picos cromatográficos: um pico referente as proteínas que não interagiram com a matriz e outro pico, referente a Fr_{IgA1} que interagiu com a matriz e foi eluída com D-galactose. Com base nesse resultado, ficou evidente que o tempo de imobilização da rFrutalina na matriz influenciou proporcionalmente na sua capacidade de retenção do ligante, já que a matriz submetida a imobilização lectínica por 12 h apresentou um melhor desempenho cromatográfico, quando se compara a quantidade de IgA₁ eluída no pico 2. É

importante destacar que esse desempenho foi similar ao da matriz comercial. Foi observado também que as frações retidas nas matrizes agarose-rFrutalina demoraram um pouco mais para serem removidas da coluna. Possivelmente, isso ocorreu devido uma maior afinidade e interação das IgA₁ pela rFrutalina presente na matriz.

A análise eletroforética das Fr_{IgA1} retidas na matriz agarose-rFrutalina (imobilizada 12 h) e na matriz comercial (imobilizada com a jacalina), sob condição reduzida, revelou a presença de três bandas proteicas em ambas as frações (Figuras 19), o mesmo o padrão revelado por Michael *et al.* (1997): uma banda massa molecular aparente de 83 KDa, referente ao componente secretor; uma banda de 60 KDa, referente a cadeia pesada ou α ; e uma banda de 25 KDa referente a cadeia leve.

Figura 19. Análise eletroforética das frações ricas em IgA1 (Fr_{IgA1}) retidas nas matrizes de agarose-rFrutalina e *Immobilized Jacalin*®.(A) A análise eletroforética foi feita sob condição redutora em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS. Alíquotas de 20 μ L foram aplicadas no gel, sendo: M – marcadores moleculares; 1 – Fr_{IgA1} retida na coluna *Immobilized Jacalin*; 2 - Fr_{IgA1} retida na matriz agarose-rFrutalina.



Fonte: Autor, (2016)

6. CONCLUSÃO

A lectina rFrutalina é estável em temperaturas de até 55 e pH 9,0 e tem parâmetros bioquímicos bastante semelhantes ao da frutalnia nativa (estrutura secundária, oligomerização, peso molecular) sendo útil para substituir a proteína nativa em estudos de sua atividade e aplicações biotecnológicas. Isto ficou evidente na capacidade da rFrutalina, quando imobilizada em agarose, em purificar IgA1 a partir de colostro humano. O tempo de contato é determinante para a capacidade de retenção pela coluna agarose-rFrutalina sendo que o tempo de 12 horas de imobilização mostrou uma capacidade de retenção equivalente a matriz atualmente comercializada para esta finalidade, podendo ser usada com uma alternativa eficiente à matriz comercial.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, CAS; CORREIA, MTS; COELHO, LCBB; NASCIMENTO, SC; SANTOS-MAGALHÃES, NS. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 435-45, 2004.
- ARENDASH, GW; JENSEN, MT; SALEM JR., N; HUSSEIN, N; CRACCHIOLO, J; DICKSON, A; LEIGHTY, R; POTTER, H. A diet high in omega-3 fatty acids does not improve or protect cognitive performance in Alzheimer's transgenic mice. **Neuroscience**, v. 149, p. 286–302, 2007.
- ASENSIO J.L., CANADA F.J., SIEBERT H.C., LAYNEZ J., POVEDA A., NIETO P.M., SOEDJANAAMADJA U., GABIUS H.J., JIMENEZ-BARBERO J., Structural basis for chitin recognition by defense proteins: GlcNAc residues are bound in a multivalent fashion by extended binding sites in hevein domains, **Chem. Biol.** 7; 529– 543. 2000
- BABÁL, P; JANEGA, P; CERNÁ, A; KHOLOVÁ, I; BRABENCOVÁ, E. Neoplastic transformation of the thyroid gland is accompanied by changes in cellular sialylation. **Acta Histochem.**, v. 108, p. 133-40, 2006.
- BAENZIER, J. AND KORNFELD, S. Structure of the carbohydrate units of IgA1 immunoglobulin. II. Structure of the o-glycosidically linked oligosaccharide units. **J. Biol. Chem.** 249, 7270. 1974
- BAH, C.S.; FANG, E.F.; NG, T.B.; MROS, S.; MCCONNELL, M.; BEKHIT AEL, D. Purification and characterization of a rhamnose-binding chinook salmon roe lectin with antiproliferative activity toward tumor cells and nitric oxide-inducing activity toward murine macrophages. **J. Agric. Food Chem.** 59, 5720–5728. 2011
- BALZARINI, J., SCHOLS, D., NEYTS, J., VAN DAMME, E.J., PEUMANS, W.J., DE CLERCQ, E. Alpha-(1-3)- and alpha-(1-6)-D-mannose-specific plant lectins are markedly inhibitory to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus infections in vitro. **Antimicrob Agents Chemother.** 35(3): 410-416, 1991.
- BALZARINI, J., NEYTS, J., SCHOLS, D., HOSOYA, M., VAN DAMME, E.J., PEUMANS, W.J., DE CLERCQ, E.. The mannose specific plant lectins from *Cymbidium* hybrid and *Epipactis helleborine* and the (N-acetylglucosamine)n-specific plant lectin from *Urtica dioica* are and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication in vitro. **Antiviral Res.** 18(2): 191-207, 1992.
- BANERJEE, S., S. CHAKI, J. BHOWAL; B.P. CHATTERJEE. Muchin binding mitogenic lectin from freshwater Indian gastropod *Belamya bengalensis*: Purification and molecular characterization. **Arch. Biochem. Biophys.** 421: 125-134. 2004.
- BAROU O, MEKRALDI S, VICO L, BOIVIN G, ALEXANDRE C, LAFAGE-PROUST MH. Relationships between trabecular bone remodeling and bone vascularization: a quantitative study. **Bone**;30:604-12. 2002

BASU, P. S.; MAJHI, R.; BATABYAL, S. K. Lectin and serum-PSA interaction as a screening test for prostate cancer. **Clinical Biochemistry** 36: 373-376, 2003.

BELTRÃO, EIC; CORREIA, MTS; FIGUEREDO-SILVA, J; COELHO, LCBB. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. **Appl. Biochem. Biotech.**, v. 74, p. 125-34, 1998.

BELTRÃO, EIC; MEDEIROS, PL; RODRIGUES, OG; FIGUEREDO-SILVA, J; VALENÇA, MM; COELHO, LCBB; CARVALHO JR., LB. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningothelial tumor. **European Journal of Histochemistry**, v. 47, p. 139-42, 2003.

BANERJEE, S.; CHAKI, S.; BHOWAL, J.; CHATTERJEE, B.P.; Mucin binding mitogenic lectin from freshwater indian *Belamya bengalensis*: purification and molecular characterization. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 421, p. 125-134, 2004.

BEYER, K; CASTRO, R; BIRNBAUM, A; BENKOV; PITTMAN, N; SAMPSON, H.A. Human milk-specific mucosal lymphocytes of the gastrointestinal tract display a Th 2 cytokine profile. **J. Allergy Clin. Immunol.** 109(4): 707-113. 2002.

BIES C, LEHR CM, WOODLEY JF. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Adv Drug Deliver Rev.** 56: 425– 435. 2004.

BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis.** 8:93-99. 1987.

BRADFORD M.M.A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. **Anal Biochem.** 72: 248–254. 1976.

BRANDO-LIMA, A. C.; SALDANHA-GAMA, R. F.; PEREIRA, C. R.; VILLELA, C. G.; SAMPAIO, A. L. F.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; HENRIQUES, M. G., BARJA-FIDALGO, C. Involvement of phosphatidylinositol-3 kinase–Akt and nuclear factor kappa-B pathways in the effect of frutalin on human lymphocyte. **Intern. Immunopharmacology.** 6(3): 465-472. 2006.

BREWER, C.F.; MICELI, M.C.; BAUM, L.G. Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions. **Curr Opin Struct Biol.**, v. 12, p. 616-623, 2002.

BRINCK, U; KORABIOWSKA, M; BOSBACH, R; GABIUS, HJ. Detection of inflammation – and Neoplasia – associated alterations in human large intestine using plant/invertebrate lectins, galectin-1 and neoglycoproteins. **Acta Anatomica**, v. 161, p. 219-33, 1998.

CAVADA BS, SANTOS CF, GRANGEIRO TB, NUNES EP, SALES PV, RAMOS RL, SOUSA FA, CRISOSTOMO CV, CALVETE J.J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. **Phytochemistry.** 49: 675–680. 1998.

- CAVALCANTE N.F.J., ANDRADE M.E.B. Imunologia da amebíase. **Rev Bras Alerg Immunopatol**;18:65-76. 1995
- CHATTERJEE, B.P., VAITH, P., CHATTERJEE, S., KARDUCK, D., UHLENBRUCK, G.,. Comparative studies of new marker lectins for alkali-labile carbohydrate chains in glycoproteins. **International Journal of Biochemistry** 10, 321–327. 1979
- CHINTALACHARUVU K.R., YU L.J. ,BHOLA N., KOBAYASHI K., FERNANDEZ C.Z., MORRISON S.L., Cysteine residues required for the attachment of the light chain in human IgA2, **J. Immunol.** 169 5072–5077. 2002
- CHOWDHURY, S., AHMED, H., CHATTERJEE, B.P.: Purification and characterization of an α -D-galactopyranosyl binding lectin from *Artocarpus lakoocha* seeds. **Carbohydr. Res.** 159, 137–148 . 1987
- CHOWDHURY S., AHMED H., CHATTERJEE B.P. Chemical modification studies of *Artocarpus lakoocha* lectin artocarpin. **Biochimie.**73:563–71. 1991
- COLTRI K.C., OLIVEIRA L.L., PINZAN C.F., VENDRUSCOLO P.E., MARTINEZ R., GOLDMAN M.H., et al. Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a TLR2-dependent mechanism. **Am J Pathol.** 2008
- COSTA CARVALHO BT. Imunologia do leite materno. **Rev Bras Alerg Immunol**;15:30-4. 1992
- CUMMINGS BJ, SU JH, GEDDES JW, VAN NOSTRAND WE, WAGNER SL, CUNNINGHAM DD, ET AL. Aggregation of the amyloid precursor protein within degenerating neurons and dystrophic neurites in Alzheimer's disease. **Neuroscience**;48:763-77.1992
- DAI, Z., KAWDE, A.N., XIANG, Y., BELLE, J.T.L., GERLACH, J., BHAVANANDAN, V.P., JOSHI, L., WANG, J. Nanoparticle-based sensing of glycan–lectin interactions. **J. Am. Chem. Soc.** 128, 10018–10019. 2006
- DANGUY, A; DECAESTECKER, C; GENTEN, F; SALMON, I; KISS, R. Applications of lectins and Neoglycoconjugates in histology and pathology. **Acta Anatomica**, v. 161, p. 206-18, 1998.
- DE MIRANDA-SANTOS I.K., MENGEL J.O.J., BUNN-MORENO M.M., CAMPOS-NETO A. Activation of T and B cells by a crude extract of *Artocarpus integrifolia* is mediated by a lectin distinct from jacalin. **J Immunol Methods**;140:197–203. 1991
- DECHANT M. , VALERIUS T. IgA antibodies for cancer therapy. **Critical Reviews in Oncology/Hematology** 39. 69–77. 2001
- DECHANT, M., VIDARSSON, G., STOCKMEYER, B., REPP, R., GLENNIE, M.J., GRAMATZKI, M., VAN DE WINKEL, J.G.J., VALERIUS, T. Chimeric IgA antibodies against HLA class II effectively trigger lymphoma cell killing. **Blood** 100, 4574. 2002

DECHANT, M., BEYER, T., SCHNEIDER-MERCK, T., WEISNER, W., PEIPP, M., VAN DE WINKEL, J.G., VALERIUS, T. Effector mechanisms of recombinant IgA antibodies against epidermal growth factor receptor. **J. Immunol.** 179, 2936. 2007

DUTTA, I., MAJUMDER, P., SAHA, P., RAY, K., DAS, S. Constitutive and phloem specific expression of *Allium sativum* leaf agglutinin (ASAL) to engineer aphid (*Lipaphis erysimi*) resistance in transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*). **Plant Science.** 169: 996–1007, 2005.

EIBL M.M., WOLF H.M., FÜRNKRANZ H., ROSENKRANZ A. Prevention of necrotizing enterocolitis in low-birth-weight infants by IgA-IgG feeding. **N Engl J Med;** 319:1–7. 1988

EL-BOUBBOU, K., ZHU, D.C., VASILEIOU, C., BORHAN, B., PROSPERI, D., LI, W., HUANG, X. Magnetic glyco-nanoparticles: a tool to detect, differentiate, and unlock the glyco-codes of cancer via magnetic resonance imaging. **J. Am. Chem. Soc.** 132, 4490–4499. 2010

FANG, E.F.; NG, T.B. *Antitumor Potential and Other Emerging Medicinal Properties of Natural Compounds*; **Springer: Dordrecht, The Netherlands**, 2013

FERNANDEZ M.I., PEDRON T., TOURNEBIZE R., OLIVO-MARIN J.C., SANSONETTI P.J., PHALIPON A. Anti-inflammatory role for intracellular dimeric immunoglobulin a by neutralization of lipopolysaccharide in epithelial cells. **Immunity** 18, 739– 749. 2003

FERREIRA, M.V.P. Frutalina, lectina α -D-galactose ligante de *Artocarpus incisa* L. um estudo com câncer de mama. **Doutorado.** Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará. 145p. Fortaleza, Ceará. 2001.

FERREIRA, J.A., DANIEL-DA-SILVA, A.L., ALVES, R.M.P., DUARTE, D., VIEIRA, I., SANTOS, L.L., VITORINO, R., AMADO, F.,. Synthesis and optimization of lectin functionalized nanoprobe for the selective recovery of glycoproteins from human body fluids. **Anal. Chem.** 83, 7035–7043. 2011

FITCHES, E; EDWARDS, MG; MEE, C; GRISHIN, E; GATEHOUSE, AMR; EDWARDS, JP; GATEHOUSE, JA. Fusion proteins containing insect-specific toxins as pest control agents: snowdrop lectin delivers fused insecticidal spider venom toxin to insect haemolymph following oral ingestion. **Journal of Insect Physiology**, v. 50, p. 61-70, 2004.

FIEDLER A, REINERT T, MORAWSKI M, BRÜCKNER G, ARENDT T, BUTZ T. Intracellular iron concentration of neurons with and without perineuronal nets. **Nucl Instr and Meth in Phys Res B** 2007;260:153-8.

FRANCESCHINI, V; LAZZARI, M; CIANI, F. Lectin cytochemical localization of glycoconjugates in the olfactory system of the lizards *Lacerta viridis* and *Podarcis sicula*. **Anatomy and Embryology**, v. 202, p. 49-54, 2000.

FRANCO-FRAGUAS, L.; PLÁ, A.; FERREIRA, F.; MASSALDI, H.; SUÁREZ, N.; BATISTA-VIEIRA, F. Preparation of soybean agglutinin by affinity chromatography and its immobilization for polysaccharide isolation. **Journal of Chromatography B**. v. 790. p. 365-372. 2003.

FU, L., ZHOU, C., YAO, S., YU, J., LIU, B., & BAO, J. (2011). Plant lectins: targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. **The international journal of biochemistry & cell biology**, 43(10), 1442–9. doi:10.1016/j.biocel.2011.07.004

GABIUS, H. J., ANDRÉ S., KALTNER, H., SIEBERT, H. C. The sugar code: functional lectinomics. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1572: 165– 177. 2002.

GAN Y.J., CHODOSH J., MORGAN A., SIXBEY J.W. Epithelial cell polarization is a determinant in the infectious outcome of immunoglobulin A-mediated entry by Epstein-Barr virus, **J. Virol.** 71, 519–526. 1997

GABOR, F.; BOGNER, E., WEISSENBOECK, A., WIRTH, M. The lectin-cell interaction and its implications to intestinal lectin-mediated drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews** 56: 459-480, 2004.

GAIKWAD, S.M., GURJAR, M.M., AND KHAN, M.I. *Artocarpus hirsuta* lectin. Differential modes of chemical and thermal denaturation. **Eur. J. Biochem.** 269 1413–1417. 2002

GAIKWAD, S.M. AND KHAN, M.I. pH-dependent aggregation of oligomeric *Artocarpus hirsuta* lectin on thermal denaturation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 311 254–257. 2003

GAVROVIC-JANKULOVIC, M; POULSEN, K; BRCKALO, T; BOBIC, S; LINDNER, B; PETERSEN, A. A novel recombinantly produced banana lectin isoform is a valuable tool for glycoproteomics and a potent modulator of the proliferation response in CD3+, CD4+, and CD8+ populations of human PBMCs. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 40, p. 929-41, 2008.

GEMEINER P, MISLOVIČOVÁ D, TKÁČ J, ŠVITEL, PÄTOPRSTÝ V, HRABÁROVÁ E, KOGAN G, KOŽÁR T. Lectinomics II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. **Biotechnology Adv.** 27: 1–15. 2009.

GHOSH, D; MAITI, TK. Immunomodulatory and anti-tumor activities of native and heat denatured Abrus agglutinin. **Immunobiology**, v. 212, p. 589-99, 2007.

GÖRG, A. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis.** 21:1037-1053. 2000.

HARABUCHI Y, FADEN H, YAMANAKA N, DUFFY L, WOLF J, KRISTOFIK D. Human milk secretory IgA antibody to nontypeable Haemophilus influenzae: possible protective effects against nasopharyngeal colonization. **J Pediatr**; 124:193-8.1994

HARATA K., MURAKI M., Crystal structures of *Urtica dioica* agglutinin and its complex with tri-N-acetylchitotriose, **J. Mol. Biol.** 297; 671– 673. 2000

HAYASHIDA M., FUJII T., HAMASU M., ISHIGURO M., HATA Y., Similarity

between protein– protein and protein– carbohydrate interactions, revealed by two crystal structures of lectins from the roots of pokeweed. **J. Mol. Biol.** 334. 551– 565. 2003

HEMMORANTA H, SATOMAA T, BLOMQVIST M, HEISKANEN A, AITIO O, SAARINEN J, ET AL. N-glycan structures and associated gene expression reflect the characteristic N-glycosylation pattern of human hematopoietic stem and progenitor cells. **Exp Hematol** ;35:1279-92. 2007

HENRY CJ, REES DG. New predictive equations for the estimation of basal metabolic rate in tropical peoples. **Eur J Clin Nutr**;45:177-85. 1991

HERR, A.B., BALLISTER, E.R., BJORKMAN, P.J. Insights into IgA-mediated immuneresponses from the crystal structures of human Fc α RI and its complexwith IgA1-Fc. **Nature** 423, 614. 2003

HEREMANS, J. F.; HEREMANS, M. T.; SHULTZE, H. E. Isolation and description of a few properties of the A globulin of human serum. **Clin. Chim. Acta.** p. 4-96. 1959.

HOLANDA, M.L, MELO, V.M.M, SILVA, L.M.C.M., , AMORIM, R.C.N, PEREIRA, M.G and BENEVIDES, N.M.B. Differential activity of a lectin from *Solieria filiformis* against 85 human pathogenic bacteria. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** 38: 1769-1773, 2005.

HULS GA, HEIJNEN IA, CUOMO ME. A recombinant, fully human monoclonal antibody with antitumor activity constructed from phage-displayed antibody fragments. **Nat Biotechnol** 17(3):276–81.1999

ISHIKAWA T, ZHU B-L, LI D-R, ZHAO D, MICHIEU T, MAEDA H. Age-dependent increase of clusterin in the human pituitary gland. **Legal Med**;8:28-33. 2006

JAGTAP, U.B., BAPAT, V.A. Artocarpus: a review of traditional uses, ethnopharmacology and phytochemistry. **J. Ethnopharmacol.** 129, 142–166. 2010.

JARRET, F.M.,. Studies in Artocarpus and allied genera. III. A revision of Artocarpus subgenus Artocarpus. **Journal of Arnold Arboretum** 40, 1–298. 1959

KABIR, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed derived lectin of versatile applications in immunological research. **J. Immunol. Methods** 212, 193–211. 1998

KANRAR, S; VENKATESWARI, JC; KIRTI, PB; CHOPRA, VL. Transgenic expression of hevein, the rubber tree lectin, in Indian mustard confers protection against *Alternaria brassicae*. **Plant Science**, v. 162, p. 441-8, 2002.

KARASAKI, Y; TSUKAMOTO, S; MIZUSAKI, K; SUGIURA, T; GOTOH, S. A garlic lectin exerted an antitumor activity and induced apoptosis in human tumor cells. **Food Research International**, v. 34, p. 7-13, 2001.

- KAUR, N., SINGH, J., KAMBOJ, S. S., AGREWALA, J. N., KAUR, M. Two novel lectins from *Parkia biglandulosa* and *Parkia roxburghii*: isolation, physicochemical characterization, mitogenicity and anti-proliferative activity. **Protein Pept Lett.** 12(6): 585-95. 2005.
- KAUR, M., SINGH, K., RUP, P.J., SAXENA, A.K., KHAN, R.H., ASHRAF, M.T., KAMBOJ, S.S., SINGH, J. A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with anti-insect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on human cancer cell. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, p. 156-165, 2006.
- KENNEDY, J.F.; PAIVA, P.M.G.; CORELLA, M.T.S.; CAVALCANTI, M.S.M.; COELHO, L.C.B.B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers* V. 26, o.219-230. 1995
- KILPATRICK, D.C. Animal lectins: A historical introduction and overview. **Biochim. Biophys. Acta**, 1572, 187–197. 2002
- KIM, M.; RAO, M.V.; Tweardy, D.J.; Prakash, M.; Galili, U.; Gorelik, E. Lectin-induced apoptosis of tumor-cells. **Glycobiology** 3, 447–453. 1993
- KIMBLE, B.; RAMIREZ NIETO, G.; PEREZ, D. R. Characterization of influenza virus sialic acid receptors in minor poultry species. **Virology**, 7, 365, 2010.
- KITADA, M.; KURODA, Y.; DEZAWA, M. Lectins as a Tool for Detecting Neural Stem/ Progenitor Cells in the Adult Mouse Brain. **Anat. Rec. Hoboken.**, 1, 1-19, 2010.
- KOMPELLA, U.B.; LEE, V.H.L. Delivery systems for penetration enhancement of peptide and protein drugs: **Design considerations.** **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 46, 211–245. 2001
- KUMAR, G.S., APPUKUTTAN, P.S., BASU, D. a-D-Galactose-specific lectin from jackfruit _ *Artocarpus integra*. seed. **J. Biosci.** 4, 257. 1982
- KUNSTFELD, R; PETZELBAUER, P. A unique case of a benign disseminated angioproliferation combining features of Kaposi's sarcoma and diffuse dermal angioendotheliomatosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 45, p. 601-5, 2001.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 227: 680–685. 1970..
- LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: production and practical applications. **Appl Microbiol Biotechnol.** 89: 45–55. 2011.
- LEITE, YFMM; SILVA, LMCM; AMORIM, RCN; FREIRE, EA; JORGE, DMM; GRANGEIRO, T.B; BENEVIDES, NMB. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1724, p. 137-45, 2005.

LI, YR; LIU, QH; WANG, HX; NG, TB. A novel lectin with potent antitumor, mitogenic and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from the edible mushroom *Pleurotus citrinopileatus*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)** - General Subjects, v. 1780, p. 51-7, 2008.

LIU, F; ZAIDI, T; IQBAL, K; GRUNDKE-IQBAL, I; MERKLE, RK; GONG, C-X. Role of glycosylation in hyperphosphorylation of tau in Alzheimer's disease. **FEBS Letters**, v. 512, p. 101-6, 2002.

LIU, Q; WANG, H; NG, TB. First report of a xylose-specific lectin with potent hemagglutinating, antiproliferative and anti-mitogenic activities from a wild ascomycete mushroom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)** - General Subjects, v. 1760, p. 1914-9, 2006.

LIS, H., SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chem. Rev.** 98: 637–674, 1998.

MACAULEY-PATRICKS., FAZENDA M.L., MCNEIL B., Harvey L.M., Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system, **Yeast** 22 249–270. 2005

MCCAFFERTY, HRK; MOORE, PH; ZHU, YJ. Papaya transformed with the *Galanthus nivalis* GNA gene produces a biologically active lectin with spider mite control activity. **Plant Science**, 2008.

MACIEL, E. V. M., ARAUJO-FILHO, V. S., NAKAZAWA, M., GOMES, Y. M., COELHO, L. C. B. B., CORREIA, M. T. S. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals** 32: 57-60, 2004.

MACPHERSON, A.J., GATTO, D., SAINSBURY, E., HARRIMAN, G.R., HENGARTNER, H., ZINKERNAGEL, R.M. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. **Science**. 2000

MACPHERSON A.J, UHR T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cell carrying commensal bacteria. **Science**;303:1662–5. 2004

MADHURA M. GURJAR, M. ISLAM KHAN, SUSHAMA M. GAIKWAD. a-Galactoside binding lectin from *Artocarpus hirsuta*: characterization of the sugar specificity and binding site. **Biochimica et Biophysica Acta**. 138. 256–264. 1998

MARCH, S. C; PARIKH, I.; CUATRECASAS, P. A simplified method for cyanogens bromide activation of agarose for affinity chromatography. **Analytical Biochemistry**, 60, p.149-152. 1974.

MATSUDA H, PONGPIRIYADACHA Y, MORIKAWA T, OCHI M, YOSHIKAWA M. Gastroprotective effects of phenylpropanoids from the rhizomes of *Alpinia galanga* in rats: structural requirements and mode of action. **Eur J Pharmacol** ;471(1):59–67. 2003

MEDEIROS, A.; BIANCHI, S., CALVETTE, J.J.; BALTER, H., BAY, S., ROBLES, A., CANTACUZENE, D., NIMTZ, Z., ALZARI, P.M., OSINAGA, E. Biochemical and functional characterization of the Tn-specific lectin from *Salvia sclarea* seeds. **Eur. J.Biochem.** 207 (5): 1434-40, 2000.

MEDINA-FLORES R, WANG G, BISSEL SJ, MURPHEY-CORB M, WILEYA CA. Destruction of extracellular matrix proteoglycans is pervasive in simian retroviral neuroinfection. **Neurobiol Dis**;16:604-16. 2004

MENDONÇA, S. E.S.. Elucidation of the molecular mechanisms underlying the cytotoxic effect of recombinant frutalin in human tumor cells. **Dissertação** de mestrado integrado em Engenharia Biomédica . Universidade do Minho. 2013

MESTECKY, J. Structural aspects of human polymeric IgA. **Ric. Clin. Lab.** 6, 87. 1976

MEYER, W; BOLLHORN, M; STEDE, M. Aspects of general antimicrobial properties of skin secretions in the common seal *Phoca vitulina*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 41, p. 77-9, 2000.

MILHOME, M. V. L. Frutalina, lectina α -D-galactose ligante de *Artocarpus incisa* L. no estudo com câncer de tireoide humana. **Dissertação**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará. 69p. Fortaleza, Ceará. 2003.

MINNASCH P, YAMAMOTO Y, OHKUBO I, NISHI K. Demonstration of puromycin-sensitive alanyl aminopeptidase in Alzheimer disease brain. **Legal Med**;5:S285-7. 2003

MISQUITH S., RANI P.G., SUROLIA A. Carbohydrate binding specificity of the B cell maturation mitogen from *Artocarpus integrifolia* seeds. **J Biol Chem.** 269:30393–401. 1994

MOLINA, M. C.; VINCENTE, C. Correlations between enzymatic activity of lectins, putrescine content and chloroplast damage in *Xanthoria parietina* phycobionts. **Cell Adhes Commun.**, 3(1):1-12. 1995.

MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O. Caracterização estrutural de três lectinas com especificidades por açúcar distintas, isoladas de sementes de fruta-pão (*Artocarpus incisa* L.) **Tese**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará. 110p. Fortaleza, Ceará. 2002.

MONTEIRO-MOREIRA A.C.O, PEREIRA H. D'MUNIZ, NETO, A.E.V., MORENO F.B.M.B., LOBO M.D.P, DE SOUSA F.D., MOREIRA R.A. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of frutalin, an α -D-galactose-specific lectin from *Artocarpus incisa* seeds. **Structura Biology Communications**. 2015

MONTEIRO, R.C., VAN DE WINKEL, J.G. IgA Fc receptors. **Annu. Rev. Immunol.** 21,177. 2003

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

MOREIRA, R. A.; AINOUIZ, I. L. Lectins from seeds of jackfruit (*Artocarpus integrifolia*): isolation and purification of two isolectins from the albumin fractions. **Biol. Plant.** 23(3):186-192. 1981.

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

MOREIRA R.A, CASTELO-BRANCO C.C, MONTEIRO A.C, TAVARES R.O, BELTRAMINI, L.M. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochemistry**, 47(7):1183-1188. 1998

MOSTOV KE. Transepithelial transport of immunoglobulins. **Annu Rev Immunol**; 12:63–84. 1994

NEPOMUCENO, D. R. Clonagem e expressão de uma lectina de *Artocarpus incisa* L. (frutalina) em *Escherichia coli*. **Dissertação**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará. 81p. Fortaleza, Ceará. 2008.

NG'WALALI, PM; YONEMITSU, K; KIBAYASHI, K; TSUNENARI, S. Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease in forensic autopsy of elderly persons with fatal accident. **Legal Medicine**, v. 4, p. 223-31, 2002.

NI, Y.; TIZARD, I. Lectin-carbohydrate interaction in the immune system. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 55, 205–223. 1996

NISHI K, TANEGASHIMA A, YAMAMOTO Y, USHIYAMA I, IKEMOTO I, YAMASAKI S, ET AL. Utilization of lectin-histochemistry in forensic neuropathology: lectin staining provides useful information for postmortem diagnosis in forensic neuropathology. **Legal Med**;5:117-31. 2003

NISHIMURA, A; SAWADA, S; USHIYAMA, I; YAMAMOTO, Y; NAKAGAWA, T; TANEGASHIMA, A; NISHI, K. Lectin-histochemical detection of degenerative glycoconjugate deposits in human brain. **Forensic Science International**, v. 113, p. 265-9, 2000.

NOBRE, T. M., PAVINATTO, F. J., COMINETTI, M. R., SELISTRE DE-ARAÚJO, H. S., ZANIQUELLI, M. E. D. & BELTRAMINI, L. M. **BIOCHIM. Biophys. Acta**, 1798, 1547–1555. 2010

NOWELL, P.C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes. **Cancer Res.**, 20:426-426, 1960.

OLIVEIRA, C.; FELIX, W.; MOREIRA, R. A.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Expression of frutalin, an alpha-D-galactose-binding jacalin-related lectin, in the yeast *Pichia pastoris*. **Protein expression and purification**. 60(2): 188-193. 2008

OLIVEIRA C., COSTA S., TEIXEIRA J.A. E DOMINGUES L., "cDNA cloning and functional expression of the α -d-galactosebinding lectin frutalin in *Escherichia coli*," **Molecular Biotechnology**, vol. 43, no. 3, pp. 212–220, 2009

OLIVEIRA,C.,NICOLAU,A.,TEIXEIRA,J.A.,ANDDOMINGUES,L. Cytotoxic effects of native and recombinant frutalin, a plant galactose-binding lectin, on HeLa cervical cancer cells. **J. Biomed.Biotechnol.** 2011

OLIVEIRA, C.; TEIXEIRA, J. A; DOMINGUES, L. Recombinant lectins: an array of tailor-made glycan-interaction biosynthetic tools. **Critical Reviews in Biotechnology**, 33 (1): 66-80. 2013.

OTTEN, M.A., RUDOLPH, E., DECHANT, M., TUK, C.W., REIJMERS, R.M., BEELEN, R.H., VAN DE WINKEL, J.G., VAN EGMOND, M. Immature neutrophils mediate tumor cell killing via IgA but not IgG Fc receptors. **J. Immunol.** 174, 5472. 2005

PANUNTO-CASTELO A, SOUZA M.A., ROQUE-BARREIRA M.C., SILVA J.S. KM+, a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. **Glycobiology** 11:1035–42. 2001

PEDINI V, SCOCCO P, GARGIULO AM, CECCARELLI P, LORVIK S. Glycoconjugate characterization in the intestine of *Umbrina cirrosa* by means of lectin histochemistry. **J Fish Biol** 2002;61:1363- 72.

PEREIRA, V.J. ,KAPLAN, M.A.C. ARTOCARPUS: Um gênero exótico de grande bioatividade. **Floresta e Ambiente**. Jan./Mar. ; 20(1):1-15. 2013

PEREIRA, M.E., LOURES, M.A., VILLALTA, F. AND ANDRADE, A.F.B. Lectin receptors as markers for *Trypanosoma cruzi*: Developmental stages and a study of the interaction of wheat germ agglutinin with sialic acid residues on epimastigote cells. **J. Exp. Med.** 152, 1375. 1980

PEUMANS, W.J., SMEETS, K., VAN NERUM, K., VAN LEUVEN, F., VAN DAMME, E.J.M. Lectin and alliinase are the predominant proteins in nectar from leek (*Allium porrum* L.) flowers. **Planta** 201, 298–302 1997

PEUMANS, W. J. & VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**. 109: 347-352. 1995.

PHALIPON A, CARDONA A, KRAEHENBUHL JP, EDELMAN L, SANSONETTI PJ, CORTHÉSY B. Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo. **Immunity** ;17:107–15. 2002

PINTO-DA-SILVA L.L , PANUNTO-CASTELO A , DE SOUZA GOLDMAN M.H. ROQUE BARREIRA M.C., DE-OLIVEIRA R.S., DIAS-BARUFFI M., BLANCO DE MOLFETTA MACHADO. **J. WIPO**, Patent WO2004100861; 2004.

PRATAP JV, JEYAPRAKASH AA, RANI PG, SUROLIA SA, VIJAYAN M. Crystal structures of artocarpin, a Moraceae lectin with mannose specificity, and its complex with methyl- α -D-mannose: implications to the generation of carbohydrate specificity. **J Mol Biol** ;317:237–47. 2002

PRESTES M.E.B. *A investigação da natureza no Brasil colônia*. São Paulo: Annablume, Fapesp; 2000.

PUSTZAI, A. **Plant Lectins**. Cambridge University Press. 1991.

RAMESH, S; NAGADHARA, D; REDDY, VD; RAO, KV. Production of transgenic indica rice resistant to yellow stem borer and sap-sucking insects, using super-binary vectors of *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Science**, v. 166, p. 1077-85, 2004.

RATANAPO, S., NGAMJUNYAPORN, W., CHULAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae* pv mori. **Plant Science**, 160: 739-744. 2001.

RANI P.G., BACHHAWAT K., MISQUITH S., SUROLIA A. Thermodynamic studies of saccharide binding to artocarpin, a B-cell mitogen, reveals the extended nature of its interaction with mannotriose [3,6-di-O-(α -D-mannopyranosyl)-D-mannose]. **J Biol Chem**. 274:29694–8. 1999

RANI P.G., BACHHAWAT K., REDDY G.B., OSCARSON S., SUROLIA A. Isothermal titration calorimetric studies on the binding of deoxytrimannose derivatives with artocarpin: implications for a deep-seated combining site in lectins. **Biochemistry**. 39:10755–60. 2000

RENEGAR KB, JACKSON GD, MESTECKY J. In vitro comparison of the biologic activities of monoclonal monomeric IgA, polymeric IgA, and secretory IgA. **J Immunol**; 160(3):1219–23.1998

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

RODRIGUES, J. S.; SANTOS-MAGALHAES, N. S.; COELHO, L. C. B. B.; COUVREUR, P.; PONCHEL, G.; GREF, R. Novel core (polyester)-shell(polysaccharide) nanoparticles: 90 protein loading and surface modification with lectins. **Journal of Controlled Release** 92: 103-112, 2003.

ROYLE L., ROOS A., HARVEY D.J., WORMALD M.R. , VAN GIJLSWIJK-JANSSEN D., REDWAN EL R.M., WILSON I.A, DAHA M.R., DWEK R.A., RUDD P.M. Secretory IgA N- and O-glycans provide a link between the innate and adaptive immune systems. **J. Biol. Chem**. 278

20140– 20153. 2003

RÚPOLO, B. S., MIRA, J.G.S., JUNIOI, O. K. Deficiência de IgA. **J Pediatr.** 74(6):433-40. 1998.

RYDZ, N.; SWYSTUN, L.L.; NOTLEY, C.; PATERSON, A.D.; RICHES, J.J.; SPONAGLE, K.; BOONYAWAT, B.; MONTGOMERY, R.R.; JAMES, P.D.; LILLICRAP, D. The c-type lectin receptor clec4m binds, internalizes, and clears von willebrand factor and contributes to the variation in plasma von willebrand factor levels. **Blood** 121, 5228–5237. 2013

SÁ, RA; NAPOLEÃO, TH; SANTOS, NDL; GOMES, FS; ALBUQUERQUE, AC; XAVIER, HS; COELHO, LCBB; BIEBER, LW; PAIVA, PMG. Induction of mortality on *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae) by *Myracrodruon urundeuva* heartwood lectin. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 2008a.

SÁ, RA; SANTOS, NDL; SILVA, CSB; NAPOLEÃO, TH; GOMES, FS; CAVADA, BS; COELHO, LCBB; NAVARRO, DMAF; BIEBER, LW; PAIVA, PMG. Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: **Toxicology & Pharmacology**, 2008b.

SANTOS-FILHO, T.G. Isolamento de glicoproteínas através de cromatografia de afinidade em colunas contendo lectinas imobilizadas. 2001. **Dissertação** (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2001.

SAHASRABUDDHE AA, GAIKWAD SM, KRISHNASASTRY MV, KHAN MI: Studies on recombinant single chain Jacalin lectin reveal reduced affinity for saccharides despite normal folding like native Jacalin. **Protein Sci** 3264-3273. 2004

SAHASRABUDDHE, A. A., AHMED, N., & KRISHNASASTRY, M. V. Stress-induced phosphorylation of caveolin-1 and p38, and down-regulation of EGFR and ERK by the dietary lectin jacalin in two human carcinoma cell lines. **Cell Stress & Chaperones**, 11, 135–147. 2006

SANTOS-DE-OLIVEIRA R, DIAS-BARUFFI M, THOMAZ SM, BELTRAMINI LM, ROQUE- BARREIRA MC. A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. **J Immunol**; 153:1798–807.1994

SANTI-GADELHA, T., GADELHA, C.A.A., ARAGÃO, K.S., OLIVEIRA, C.C., MOTA, M.R.L., GOMES, R.C., PIRES, A.F., TOYAMA, M.H., TOYAMA, D.O., SAMPIETRO, A.R., ISLÃ, M.I., QUIROGA, E.N., VATTUONE, M.A. An N acetylglucosamine oligomer binding agglutinin (lectin) from ripe *Cyphomandra betacea* Sendt. Fruits. **Plant Science**. 160: 659-667. 2001.

SANZ-APARICIO, J.; HERMOSO, J.; GRANJEIRO, T.B.; CALVETE, J.; CAVADA, B.S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from concanavalin A. **FEBS Letters**, v. 405, p. 114-118, 1997.

SASTRY, M.V.K., BANERJEE, P., PATANJALI, S.R., SWAMY, M.J., SWARNALATHA, G.V. AND SUROLIA, A. **J. Biol. Chem.** 261, 11726-11733.1986

SHARMA, V.; SUROLIA, A. Analyses of carbohydrate recognition by legume lectins: Size of the combining site loops and their primary specificity. **J. Mol. Biol.** 267, 433–445.1997

SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, 246:227-234, 1989.

SHARON N, LIS H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**. 2004; 4: 53-62.

SHEVCHENKO, A; SUNYAEV, S; LOBODA, A; SHEVCHENKO, A; BORK, P; ENS, W; STANDING, K, G. Charting the proteomes of organisms with unsequenced genomes by MALDI-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and BLAST homology searching. **Anal Chem.** 73(9): 1917-1926. 2001.

SIXBEY J.W., YAO Q.Y. Immunoglobulin A-induced shift of Epstein-Barr virus tissue tropism, **Science** 255, 1578–1580. 1992

SINGH, D.D., SAIKRISHNAN K., KUMAR P., SUROLIA, A., SEKAR, K., VIJAVAN M. Unusual sugar specificity of banana lectin *Musa paradisiaca* and its probable evolutionary origin. Crystallographic and modeling studies. **Glycobiology**. 15(10): 1025-1032, 2005.

SREERAMA, N. AND WOODY, R.W. Estimation of protein secondary structure from CD spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Anal. Biochem.** 282: 252–260. 2000

STILMARK, H. Ueber Ricin, ein giftiges Ferment aus dem Samen von Ricinus comm. And einigen Euphorbiaceen. Dorpant University. 1888. Inaug. Diss

STIRPE, F; BOLOGNESI, A; BORTOLOTTI, M; FARINI, V; LUBELLI, C; PELOSI, E; POLITO, L; DOZZA, B; STROCCHI, P; CHAMBERY, A; PARENTE, A; BARBIERI, L. Characterization of highly toxic type 2 ribosome-inactivating proteins from *Adenia lanceolata* and *Adenia stenodactyla*(Passifloraceae). **Toxicon**, v. 50, p. 94-105, 2007.

STUBBE H., BERDOZ J., KRAEHNBUHL J.P., CORTHESEY B. Polymeric IgA is superior to monomeric IgA and IgG carrying the same variable domain in preventing *Clostridium difficile* toxin A damaging of T84 monolayers, **J. Immunol.** 164, 1952–1960. 2000

SULTAN NA, KAVITHA M, SWAMY NJ. Purification and physicochemical characterization of two galactose-specific isolectins from the seeds of *Trichosanthes cordata*. **IUBMB Life** 61: 457–469. 2009

SUMMER, J. B. The globulins of the jack bean *Canavalia ensiformis*. **J. Biol. Chem.**, 37:137-142, 1919.

SUSEELAN, K.N., MITRA, R., PANDEY, R., SAINIS, K.B., and KRISHNA, T.G. Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 407: 241-247. 2002.

SZÖKE T, KAYSER K, TROJAN I, KAYSER G, FURAK J, TISZLAVICZ L, ET AL. The role of microvascularization and growth/adhesion-regulatory lectins in the prognosis of non-small cell lung cancer in stage II. **Eur J Cardiothorac Surg**;31:783-7. 2007

TANAKA, H.; CHIBA, H.; INOKOSHI, J.; KUNO, A.; SUGAI, T.; TAKAHASHI, A.; ITO, Y.; TSUNODA, M.; SUZUKI, K.; TAKÉNAKA, A. Mechanism by which the lectin actinohivin blocks hiv infection of target cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 106, 15633–15638. 2009

TANNE, A.; NEYROLLES, O. C-type lectins in immune defense against pathogens: The murine dc-sign homologue signr3 confers early protection against mycobacterium tuberculosis infection. **Virulence** 1, 285–290. 2010

TEIXEIRA CR, CAVASSANI KA, GOMES RB, TEIXEIRA MJ, ROQUE-BARREIRA M.C., CAVADA B.S., et al. Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. **Vaccine** . 24:3001–8. 2006

THÖM I, SCHULT-KRONEFELD O, BURKHOLDER I, GOERN M, ANDRITZKY B, BLONSKI K, ET AL. Lectin histochemistry of metastatic adenocarcinomas of the lung. **Lung Cancer** ;56:391-7. 2007

THOMAS JE, AUSTIN S, DALE A, MCCLEAN P, HARDING M, COWARD WA. Protection by human milk IgA against *Helicobacter pylori* infection in infancy. **Lancet**. 342:121. 1993

TOMANA, M., NIEDERMEIER, W., MESTECKY, J. AND SKVARIL, F. The carbohydrate composition of glycopeptides isolated from IgA2 immunoglobulin. In: J. Mestecky and A.R. Lawton III (Eds.), *The Immunoglobulin A System*, Vol. 45, **Advances in Experimental and Medical Biology** p. 219. 1974

TORRES O, CRUZ JR. Protection against *Campylobacter* diarrhea: role of milk IgA antibodies against bacterial surface antigens. **Acta Paediatr**; 82:835-8. 1993

TRIGUEROS, V.; LOUGARRE, A.; ALI-AHMED, D.; RAHBÉ, Y.; GUILLOT, L.C.; FOURNIER, D.; PAQUEREAU, L. *Xerocomus chrysenteron* lectin: identification of new pesticidal protein. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1621, p. 292-298, 2003.

TRINDADE, M.B., LOPES, J.L.S., COSTA, A.S., MOREIRA, A.C.M., MOREIRA, R.A., OLIVA, M.L.V., BELTRAMINI, L.M. Structural characterization of novel chitin binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. **Biochimica et Biophysica Acta** 1764, 146–152. 2006

ULFIG N, BOHL J, NEUDÖRFER F, REZAIE P. Brain macrophages and microglia in human fetal hydrocephalus. **Brain Dev**;26:307-15. 2004

URYU, K; CHEN, X-H; MARTINEZ, D; BROWNE, KD; JOHNSON, VE; GRAHAM, DI; LEE, VM-Y; TROJANOWSKI, JQ; SMITH, DH. Multiple proteins implicated in neurodegenerative diseases accumulate in axons after brain trauma in humans. **Experimental Neurology**, v. 208, p. 185- 92, 2007.

VAN DAMME EJM, PEUMANS WJ, BARRE A, ROUGÉ P. Plant Lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Cr. Rev. Plant Sci.** 17: 575-692. 1998

VAN DAMME, E.J.M., LANNOO, N., PEUMANS, W.J. Chapter 3 plant lectins. In: JEAN-CLAUDE, K., MICHEL, D., **Advances in Botanical Research. Academic Press**, 107, p. 209. 2008

VAN EGMOND, M., DAMEN, C.A., VAN SPRIEL, A.B., VIDARSSON, G., VAN GARDEREN, E., VANDE WINKEL, J.G. IgA and the IgA Fc receptor. **Trends Immunol.** 22, 205. 2001

VANDENBORRE G, SMAGGHE G, VAN DAMME EJM. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry.** 72: 1538–1550. 2011.

VAN DAMME, E.J.M., LANNOO, N., PEUMANS, W.J. Chapter 3 plant lectins. In: JEAN-CLAUDE, K., MICHEL, D., **Advances in Botanical Research. Academic Press**, 107, p. 209. 2008

proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry.** 72: 1538–1550. 2011.

VASCONCELLOS ABDON, A. P. DE, COELHO DE SOUZA, G., NORONHA COELHO DE SOUZA, L. N., PRADO VASCONCELOS, R., ARAÚJO CASTRO, C., MOREIRA GUEDES, M., PEREIRA LIMA JUNIOR, R. C. P., DE AZEVEDO MOREIRA, R., DE OLIVEIRA MONTEIRO-MOREIRA, A. C. & ROLIM CAMPOS, A. **Fitoterapia**, 83, 604–608. 2012

VASSILEV TL, VELEVA KV. Natural polyreactive IgA and IgM auto antibodies in human colostrum. **Scand J Immunol**; 44:535-9. 1996

VERHEIJ, E.W.M., CORONEL, R.E., Plant Resources of South-East Asia No. 2. **Edible Fruits and Nut. Prosea.** 1992

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

WAITERSPIEL JN, MORROW AL, GUERRERO ML, RUIZ PALACIOS GM, PICKERING LK. Secretory anti-giardia lamblia antibodies in human milk: protective effect against diarrhea. **Pediatrics**; 93:28-31.1994

WEIS, W.I.; DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Ann. Rev. Biochem.** 65, 441–473.1996

- WONG, J.H., NG, T.B. Isolation and characterization of a glucose/mannose-specific lectin with stimulatory effect on nitric oxide production by macrophages from the emperor banana. **Int J Biochem Cell Biol.**, 38(2): 234-43. 2005.
- WONGKHAM, S., BOONSIRI, P., TRISONTHI, C., SIMASATHIANSOPHON, S., WONGKHAM, C. AND ATISOOK, K. **J. Sci. Soc. Thailand** 21, 7. 1995
- WU, A.M., WU, J.H., LIN, L.H., LIN, S.H., AND LIU, J.H. Binding profile of Artocarpus integrifolia agglutinin (jacalin). **Life Sci.**, 72, 2285–2302. 2003
- YAMAMOTO, K. Intracellular lectins involved in folding and transport in the endoplasmic reticulum. **Biol. Pharm. Bull.** 32, 767–773. 2009
- YI, S.M.P.; HARSON, R.E.; ZABNER, J.; WELSH, M.J. Lectin binding and endocytosis at the apical surface of human airway epithelia. **Gene Ther.** 8, 1826–1832. 2001
- YIN, J., LI, G., REN, X., & HERRLER, G. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. **Journal of Biotechnology**, 127, 335–347. 2007
- YUE, T. and HAAB, B.B. Microarrays in Glycoproteomics Research. **Clin Lab Med.** 29: 15–29, 2009
- ZATTA, P. F., & CUMMINGS, R. D. (1992). **BIOCHEMICAL EDUCATION** 20 (1) 1992, 20(1)
- ZWIERZINA H, BERGMANN L, FIEBIG H, AAMDAL S, SCHOFFSKI P, WITTHOHN K, LENTZEN H. The preclinical and clinical activity of aviscumine: A potential anticancer drug. **Eur J Cancer.** 47: 1450–1457. 2011.