



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**PROPRIEDADES ANTIPARASITÁRIAS E ANGIOGÊNICAS DE UMA LECTINA
TIPO-C (BpLec) ISOLADA DA PEÇONHA DE *BOTHROPS PAULOENSIS***

Aluno: Letícia Eulalio Castanheira

Orientador: Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

UBERLÂNDIA - MG

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**PROPRIEDADES ANTIPARASITÁRIAS E ANGIOGÊNICAS DE UMA LECTINA
TIPO-C (BpLec) ISOLADA DA PEÇONHA DE *BOTHROPS PAULOENSIS***

Aluno: Letícia Eulalio Castanheira

Orientador: Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como
parte dos requisitos para
obtenção do Título de Doutor em
Genética e Bioquímica (Área
Bioquímica)**

UBERLÂNDIA - MG

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**PROPRIEDADES ANTIPARASITÁRIAS E ANGIOGÊNICAS DE UMA LECTINA
TIPO-C (BpLec) ISOLADA DA PEÇONHA DE *BOTHROPS PAULOENSIS***

ALUNO: Letícia Eulalio Castanheira

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Examinadores: Dra. Márcia Helena Borges (FUNED)
Dra. Tassia Rafaella Costa (FCFRP/USP)
Profa. Dra. Eloisa Amália Vieira Ferro (ICBIM/UFU)
Profa. Dra. Fernanda Assis Araújo (ICBIM/UFU)

Data da Defesa: 08/07/2016

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Tese foram contempladas

Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C346p
2016
Castanheira, Leticia Eulalio, 1987
Propriedades antiparasitárias e angiogênicas de uma lectina tipo-C
(BpLec) isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis* / Leticia Eulalio
Castanheira. - 2016.

138 f. : il.

Orientadora: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. Serpente peçonhenta - Teses. 3. Lectinas -
Teses. 4. Toxoplasmose - Teses. I. Ávila, Veridiana de Melo Rodrigues.
II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1

Dedicatória

Aos meus pais, Ione e Neto, e à minha irmã, Bruna, por todo o incentivo e apoio, por nunca terem questionado minhas escolhas e respeitado o caminho que escolhi seguir, com todo seu amor e compreensão;

Aos meus avós paternos João Ronaldo (*in memoriam*) e Cleusa, e aos meus avós maternos Cacildo (*in memoriam*) e Irene, por serem grandes exemplos a serem seguidos, por sempre incentivarem meus estudos a cada vez que me encontravam e por entenderem minha ausência nos momentos em que não pude ser tão presente e dedicada a eles;

Ao querido Leonardo, por toda a sua paciência, suas palavras constantes de incentivo e otimismo, compreensão pelos momentos difíceis e de desabafos e por compartilhar tantos momentos de alegria, com muito amor.

Agradecimentos

À minha espetacular orientadora, profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila por todos seus ensinamentos, seu incentivo e compreensão, por ser tão guerreira e nos inspirar tão brilhantemente a trilhar nosso caminho, sendo um grande exemplo como pessoa e profissional. É uma grande honra poder aprender tanto com você e lembrarei de todos os momentos com muito carinho;

Às professoras Dra. Eloisa Amália Ferro e Dra. Bellisa Freitas Barbosa (ICBIM/UFU) por terem gentilmente aberto as portas de seu laboratório para realizarmos parte do trabalho com vocês e por terem nos concedido uma experiência inesquecível e bastante enriquecedora;

Às alunas do Laboratório de Imunoparasitologia (ICBIM/UFU), especialmente à Rafaela, por nos auxiliar nos experimentos com *Toxoplasma gondii* e pela inestimável convivência;

À profa. Dra. Fernanda de Assis Araújo e seus alunos Simone Ramos Deconte e Bruno Antônio Ferreira (ICBIM/UFU), pela agradável convivência e pelo valioso auxílio nos experimentos com as esponjas *in vivo*, que nos permitiram um grande avanço no trabalho;

À profa. Dra. Fernanda Maria Santiago e à mestranda Mariana Ferreira Silva (ICBIM/UFU) pelos ensaios com os anticorpos, pelas idéias, sugestões, preciosas contribuições e permanente disponibilidade em nos ajudar;

Ao prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho e à doutoranda Patrícia Terra, do Laboratório de Nanobiotecnologia (INGEB/UFU) pela dosagem de citocinas por CBA;

À Dra. Daiana Silva Lopes, pela sua generosidade em sempre nos ajudar, pelas idéias e incentivo ao trabalho e por toda sua disponibilidade em realizar também experimentos num prazo muito curto para enriquecermos o trabalho, em um momento em que não pude estar tão presente na bancada;

Às queridas amigas Dayane, Débora e Isabela, por sempre estarem presentes com palavras de incentivo, por terem colaborado em cada passo do trabalho em que eu precisei e pelos prazerosos e inesquecíveis momentos de descontração,

desabafo, perspectivas, inestimável parceria e, sobretudo amizade. Vocês estarão para sempre em meu coração;

Aos professores, técnicos e colegas do Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais (LaBiTox) e do Instituto de Genética e Bioquímica pela convivência e auxílio nos momentos necessários;

A cada amigo, colega e/ou familiar que direta ou indiretamente contribuiu para que esse sonho fosse realizado;

À Capes, FAPEMIG e Cnpq pelo apoio financeiro.

Lista de abreviaturas

SVGaLs	Lectinas tipo-C ligantes de galactose
PHA	Lectina isolada de <i>Phaseolus vulgaris</i>
CRD	Domínio de reconhecimento ao carboidrato
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
IL-6	Interleucina-6
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
EGF	Fator de crescimento epidermal
bFGF	Fator de crescimento de fibroblastos básico
Snaclecs	Lectinas tipo-C de peçonhas de serpentes
RSL	Lectina isolada da peçonha de <i>Crotalus atrox</i>
BjcuL	Lectina isolada da peçonha de <i>Bothrops jararacussu</i>
Galatrox	Lectina isolada da peçonha de <i>Bothrops atrox</i>
BpLec	Lectina isolada da peçonha de <i>Bothrops pauloensis</i>
TGF- β 1	Fator de crescimento tumoral β 1
HeLa	Células de carcinoma de cólo de útero
MIF	Fator de inibição da migração de macrófagos
CTBS	Tampão Tris salina contendo cloreto de cálcio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio
MTT	reagente brometo de 3-[4,5-dimetil tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio
PBS	Salina tamponada com fosfato
HEPES	(N-(2-hidroxietil) piperazina-Ní-(2-ácido etanosulfônico)
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
CPRG	Clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosídeo
ELISA	Ensaio imunoabsorvente ligado a enzima
INF- γ	Interferon- γ
IL-12 p70	Interleucina-12 (proteína de 70 kDa)
IL-10	Interleucina-10
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico

DAB	3,3 diaminobenzidino
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
BIL	Lectina isolada da peçonha de <i>Bothrops leucurus</i>
BmLec	Lectina isolada da peçonha de <i>Bothrops moogeni</i>
tEnd	Células do endotélio tímico murino
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
MPO	mieloperoxidase
NAG	N-acetil-D-glicosaminidase
DisBa-01	Desintegrina recombinante da glândula venenífera de <i>Bothrops alternatus</i>
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
DMSO	dimetilsulfóxido
CBA	"Cytometric bead array"
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
ECM	Matrix extracelular

• **Índice/Sumário:**

Apresentação	1
Capítulo 1	3
1.1. Lectinas: origem, tipos e aplicações funcionais	3
1.2. Lectinas de peçonhas de serpentes (Snaclecs)	9
1.3. BpLec: uma lectina tipo-C isolada da peçonha de <i>Bothrops pauloensis</i>	17
1.4. Referências Bibliográficas	18
Capítulo 2	34
Resumo	34
1. Introdução	35
2. Material e métodos	37
2.1. Peçonha bruta e animais	37
2.2. Obtenção de BpLec e confirmação de sua identidade	38
2.2.1. Isolamento de BpLec	38
2.2.2. Eletroforese em SDS-PAGE	38
2.2.3. Atividade Hemaglutinante	39
2.3. Cultura celular	39
2.4. Viabilidade de HeLa	40
2.5. Viabilidade de taquizoítos da cepa RH	41
2.6. Adesão	41
2.7. Proliferação	42
2.8. Quantificação de citocinas	43
2.9. Ensaio imunológico	44
2.9.1. Imunizações dos animais e coleta de sangue	44
2.9.2. Preparação do soro e purificação das IgGs	44
2.9.3. Confirmação do reconhecimento de BpLec pela IgG purificada	45
2.9.4. Imunofluorescência	46
2.10. Análise estatística	47
3. Resultados e discussão	47
4. Conclusões	54
5. Agradecimentos	55
6. Conflitos de interesse	55

7. Referências bibliográficas	55
Tabela 1:	66
Figuras	67
Capítulo 3	78
Resumo	78
1. Introdução	79
2. Material e métodos	82
2.1. Animais	82
2.2. Isolamento de BpLec	82
2.3. Avaliação dos efeitos de BpLec sobre células endoteliais <i>in vitro</i>	83
2.3.1. Cultura celular	83
2.3.2. Viabilidade celular	84
2.3.3. Inibição de adesão a substratos da matriz extracelular	84
2.3.4. Inibição da formação de vasos em Matrigel	85
2.4. Avaliação dos efeitos de BpLec sobre angiogênese e inflamação <i>in vivo</i>	85
2.4.1. Implantação das esponjas	86
2.4.2. Análise bioquímica dos implantes	86
2.4.2.1. Quantificação de hemoglobina	86
2.4.2.2. Quantificação de colágeno solúvel	87
2.4.2.3. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)	87
2.4.2.4. Determinação da atividade da N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG)	88
2.4.2.5. Dosagem de citocinas	88
2.4.3. Análise histológica dos implantes	89
2.5. Análises estatísticas	89
3. Resultados e discussão	90
3.1. Avaliação dos efeitos de BpLec sobre angiogênese <i>in vitro</i>	90
3.2. Avaliação dos efeitos de BpLec sobre angiogênese e inflamação <i>in vivo</i>	93
4. Conclusões	98
5. Agradecimentos	98
6. Referências bibliográficas	98
Figuras	100

Apresentação

Peçonhas ofídicas constituem uma rica fonte de proteínas de diferentes classes com inúmeras aplicações clínicas e biotecnológicas. Muitas toxinas têm sido empregadas também como modelos estruturais para a construção de fármacos comerciais. As lectinas tipo-C são proteínas facilmente isoladas dessas peçonhas e dividem-se entre lectinas tipo-C verdadeiras e lectinas tipo-C-like. As lectinas tipo-C verdadeiras, apesar de pouco abundantes na composição proteica total da peçonha, podem ser obtidas por meio de cromatografia de afinidade, com o auxílio de resinas imobilizadas com açúcares, alvos dessas lectinas. Além disso, pequenas quantidades são necessárias para lectinas verdadeiras exercerem suas funções biológicas, com grande potencial clínico.

Lectinas tipo-C verdadeiras de peçonhas ofídicas (SVgallLs) caracterizam-se por reconhecer β -D-galactosídeos e são proteínas homodiméricas, capazes de aglutinar vários tipos celulares e apresentam efeitos inflamatórios, antitumorais, bactericidas, entre outros. BpLec é uma lectina tipo-C isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*, com cerca de 33,6 kDa e ponto isoelétrico de 5,36. Cada subunidade de BpLec é composta por aproximadamente 132 aminoácidos e a proteína é bastante estável em temperaturas até 60°C e qualquer faixa de pH. BpLec é capaz de aglutinar eritrócitos de gato e cão em baixas concentrações, além de inibir o crescimento da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e aglutinar formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

De acordo com as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, a tese aqui apresentada foi dividida em três capítulos, sendo o primeiro correspondente a uma fundamentação teórica sobre o tema experimental trabalhado durante o curso e os demais capítulos apresentam resultados advindos de ensaios de ação antiparasitária e modulação da angiogênese induzidos pela BpLec. Em razão dos resultados promissores vistos anteriormente em *Leishmania (L.) amazonensis*, o presente trabalho teve como objetivo investigar os efeitos antiparasitários de BpLec sobre formas taquizoítas de *Toxoplasma gondii*, com enfoque em adesão, proliferação e modulação da resposta imune, além de ensaios acerca da imunolocalização da toxina, relatados no capítulo 2. Parte do capítulo corresponde ao artigo de qualificação de

doutorado, já publicado na *International Journal of Biological Macromolecules* em 2015 (Vide anexo).

Ainda mais, devido a recentes publicações emergindo acerca dos efeitos de lectinas isoladas de peçonhas ofídicas sobre a angiogênese, os efeitos de BpLec sobre células endoteliais e sobre um modelo murino *in vivo* de angiogênese e inflamação foram avaliados e relatados no capítulo 3, cujos resultados serão publicados provavelmente como dois artigos, um abordando os ensaios *in vitro* e outro correspondente aos ensaios *in vivo*, em revistas internacionais indexadas, ainda a serem definidas. Foram avaliados efeitos *in vitro*, como viabilidade celular, adesão, formação de vasos e inibição da atividade biológica de BpLec por diferentes açúcares. Também foram avaliados os efeitos *in vivo* de BpLec utilizando-se um modelo de implantação de esponjas no dorso de camundongos, analisando-se parâmetros como quantificação de hemoglobina, número de vasos, colágeno e marcadores inflamatórios (atividades enzimáticas e citocinas).

CAPÍTULO 1: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1. Lectinas: origem, tipos e aplicações funcionais.

Lectinas são (glico)proteínas que reconhecem e se ligam de forma não covalente e reversível a carboidratos (KISHORE et al., 1997; GARDÈRES et al., 2015). Elas também são capazes de se ligarem a outros alvos, estabelecendo interações proteína-proteína, proteína-lipídeo ou proteína-ácido nucléico independente do reconhecimento de carboidratos (KILPATRICK, 2002; SHETTY et al., 2013). As lectinas geralmente são destituídas de atividade catalítica, além de serem bastante estáveis em uma ampla faixa de pH e temperatura e resistentes a ação de proteases (HIRABAYASHI et al., 1991; PEUMANS E VAN DAMME, 1995; MOURA et al., 2006; CASTANHEIRA et al., 2013).

O termo lectina é derivado do latim, *legere* ou *lectus*, que significa escolher (*select*), sendo que tal nomenclatura foi originada após a descoberta da capacidade das lectinas em selecionar determinados carboidratos presentes na superfície dos eritrócitos sanguíneos, levando à aglutinação celular *in vitro* (BOYD E SHAPLEIGH, 1954). O reconhecimento e especificidade de carboidratos por lectinas as tornou uma valiosa ferramenta na Glicobiologia, permitindo a identificação e análise estrutural de açúcares presentes em superfícies celulares e matrizes extracelulares, assim como aqueles conjugados a proteínas solúveis (DRICKAMER E TAYLOR, 1993). Uma pequena mudança na estrutura ou composição dos açúcares pode alterar o reconhecimento por lectinas, demonstrando a alta especificidade dessas proteínas (RINI E DRICKAMER, 1997).

A glicômica representa um campo de grande interesse biotecnológico, visto que glicanos apresentam estruturas muitas vezes mais complexas que genes e proteínas, além de serem abundantes nas superfícies dos mais variados tipos celulares (DAN et al., 2016). Estudos nesta área têm demonstrado que lectinas participam de uma diversidade de processos biológicos, atuando, por exemplo, no reconhecimento e sinalização celulares, endereçamento de glicoproteínas, adesão celular e fagocitose, tipagem sanguínea, processos de reconhecimento imune, infecções virais, bacterianas, micoplasmáticas e parasitárias, fertilização,

metástase, crescimento e diferenciação celulares (DRICKAMER E TAYLOR, 1993; SHARON E LIS, 2004; NAEEM et al., 2007).

Após a descoberta da aplicação de lectinas na obtenção de glicoproteínas e na investigação de carboidratos que compõem a superfície das células, as lectinas se tornaram foco de estudo de muitos grupos de pesquisa (BOYD E SHAPLEIGH, 1954; SHARON E LIS, 2004; LUO et al., 2011; WANG et al., 2016). Lectinas já foram encontradas em uma diversidade de organismos, desde procariotos a eucariotos, incluindo microorganismos, plantas e animais, apresentando uma ampla distribuição nos mais diversos reinos, como Monera, Protista, Fungi, Plantae e Animalia (SHARON E LIS, 2004; YINGSAKMONGKON et al., 2008; ZHANG et al., 2009; SINGH et al., 2011; LONDRIGAN et al., 2012).

Lectinas de origem vegetal são extensivamente estudadas, provavelmente devido a seu grande rendimento após o isolamento a partir de extratos brutos de plantas, possibilitando um melhor entendimento sobre suas propriedades biológicas e possíveis aplicações terapêuticas (SENGUPTA et al., 1997; NAEEM et al., 2007). Concanavalina A, isolada do feijão *Canavalia ensiformis* (AGRAWAL E GOLDSTEIN, 1967), foi a primeira lectina cujas estruturas primárias e terciárias foram primeiramente elucidadas, tornando-se um modelo estrutural e funcional para a compreensão das possíveis funções biológicas que as mais diversas lectinas apresentam (EDELMAN et al., 1972; SHARON E LIS, 2004). Ricina e Abrina, isoladas de *Ricinus communis* e *Abrus precatorius*, respectivamente, estão entre as primeiras lectinas empregadas comercialmente, servindo como modelos de antígenos para estudos imunológicos, devido a seus efeitos citotóxicos (SHARON E LIS, 2004). Concanavalina A e PHA, isolada de *Phaseolus vulgaris*, são lectinas com atividade mitogênica sobre linfócitos e contribuíram para novas descobertas sobre o funcionamento do sistema imune, como a descoberta do fator de crescimento de células T, atualmente conhecido como interleucina-2 (LINDAHL-KIESSLING, 1972; MORGAN et al., 1976; SHARON E LIS, 2004).

Lectinas vegetais atuam na fixação de nitrogênio por leguminosas e bactérias, em que as lectinas presentes na raiz da leguminosa reconhecem carboidratos presentes na superfície celular da bactéria, mediando o processo de nodulação (SHARON E LIS, 2004). Outra importante função de lectinas vegetais é

a defesa contra patógenos e predadores, corroborada pelo fato de que essas lectinas reconhecem carboidratos presentes apenas em animais e ausentes em plantas, além de estarem mais evidentes em regiões das plantas mais susceptíveis a ataques por organismos estranhos, podendo ser consideradas agentes inseticidas, fungicidas e bactericidas com utilização bastante promissora na agricultura para proteger as plantações contra patógenos e controle de pragas (PEUMANS E VAN DAMME, 1995; HAMID et al., 2013; MACEDO et al., 2015; YAN et al., 2015).

Estudos com lectinas de origem animal vêm crescendo desde a década de 1980, principalmente após o advento de técnicas recombinantes que permitiram a obtenção de proteínas pouco expressas em fontes naturais (GARTNER et al., 1980; ARAGÓN-ORTÍZ et al., 1989; AKAHANI et al., 1997; SHARON E LIS, 2004; ZHANG et al., 2009; EARL et al., 2011; WANG et al., 2014; ADVEDISSIAN et al., 2015; TSUTSUI et al., 2015). Estas proteínas são classificadas de acordo com a natureza de seus carboidratos ligantes, os processos biológicos dos quais participam, suas respectivas localizações subcelulares e a dependência de cátions divalentes para sua atividade biológica (DRICKAMER E TAYLOR, 1993). Entretanto, as lectinas das mais diversas classes apresentam como principal semelhança estrutural uma porção comum, denominada região de reconhecimento ao carboidrato (CRD, do inglês, *carbohydrate recognition domain*), responsável pela atividade ligante de carboidratos que lectinas apresentam (DRICKAMER, 1988). Os principais grupos de lectinas animais englobam principalmente as, lectinas tipo-S, lectinas tipo-P e lectinas tipo-C (DRICKAMER E TAYLOR, 1993).

Lectinas tipo-S podem ser encontradas tanto intra quanto extracelularmente e geralmente dependem de agentes redutores, como grupos tióis, para sua atividade biológica, ligando-se apenas a β -galactosídeos (DRICKAMER E TAYLOR, 1993). Lectinas tipo-P possuem manose-6-fosfato como ligante primordial e possuem atividade independente de cálcio, atuando no transporte de hidrolases do complexo de Golgi para compartimentos endossomais e lisossomais (DRICKAMER E TAYLOR, 1993; DODD E DRICKAMER, 2001; KIM et al., 2009).

Outras classes de lectinas animais também já foram descritas, como as lectinas tipo-L, que são proteínas transmembrana que atuam em compartimentos celulares em animais, enquanto em plantas estão encontradas na forma solúvel em tecidos especializados, sobretudo em sementes de leguminosas (DODD E DRICKAMER, 2001). Lectinas tipo-I, ou imunoglobulinas ligadoras de ácido siálico (Siglecs), são proteínas integrais de membrana que se assemelham estruturalmente às imunoglobulinas e estão envolvidas em interações com proteínas, anticorpos e moléculas relacionadas a adesão celular, uma vez que reconhecem majoritariamente ácido siálico e glicosaminoglicanos (CROCKER et al., 1998; DODD E DRICKAMER, 2001; ANGATA E BRINKMAN-VAN DER LINDEN, 2002). Pentraxinas, proteínas C reativas e proteínas soro-amilóides P constituem outro grupo de lectinas animais que dependem de cálcio para sua atividade e caracterizam-se por formarem pentâmeros (DRICKAMER E TAYLOR, 1993). Lectinas tipo-R são estruturalmente semelhantes à Ricina, sendo caracterizadas pela presença de uma subunidade ligante de galactose e bastante tóxica (DODD E DRICKAMER, 2001; CUMMINGS E ETZLER, 2009).

Lectinas tipo-C constituem o maior grupo de lectinas de origem animal e são extracelulares, sendo encontradas em matriz extracelular, membranas e também secretadas em soro e peçonhas (DRICKAMER E TAYLOR, 1993; CLEMETSON et al, 2009; DRICKAMER E TAYLOR, 2015). Esse grupo de lectinas requer cálcio para sua atividade biológica, ligando-se a uma ampla gama de carboidratos, além de apresentarem geralmente entre 115 e 130 resíduos de aminoácidos em cada subunidade que compõe sua estrutura tridimensional (DRICKAMER, 1993; DRICKAMER E TAYLOR, 1993). Tais lectinas também são capazes de formar oligômeros, maximizando a interação lectina-carboidrato (RINI E DRICKAMER, 1997; DRICKAMER E TAYLOR, 2015).

Muitas lectinas tipo-C atuam no sistema imune, provavelmente iniciando a sinalização celular (DRICKAMER E TAYLOR, 2015). Por exemplo, dectina-1, um importante agente antifúngico contra *Candida albicans* em humanos e camundongos, é uma lectina animal presente em membranas de macrófagos, que atua reconhecendo β -galactosídeos presentes nas membranas de fungos e, conseqüentemente, levando a ingestão e morte desse patógeno pelo sistema imune do hospedeiro, ao desencadear a sinalização por fagocitose e produção de

citocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-6 (MARA KALALA et al., 2013; DAMBUZA E BROWN, 2015; DRICKAMER E TAYLOR, 2015). Mecanismos adicionais podem ser utilizados por outras lectinas que atuam no sistema imune (DRICKAMER E TAYLOR, 2015). Ainda mais, lectinas tipo-C presentes em membranas celulares atuam como receptores que medeiam a endocitose de glicoproteínas (DRICKAMER E TAYLOR, 1993). Outras lectinas tipo-C compõem a estrutura de proteoglicanos, presentes em matrizes extracelulares, como agrecano, versicano e neurocano (DRICKAMER E TAYLOR, 1993).

Selectinas representam um grupo de lectinas tipo-C, cujos aspectos funcionais foram bastante explorados. Estas são responsáveis pelo rolamento de leucócitos durante uma resposta inflamatória, em que atuam na interação dos leucócitos com células endoteliais, sendo consequentes alvos de terapias anti-inflamatórias (SHARON E LIS, 2004; IMPELLIZZERI E CUZZOCREA, 2014). Selectinas parecem estar envolvidas também no espalhamento de algumas células tumorais para outros locais do corpo, constituindo alvos promissores na terapia antitumoral (SHARON E LIS, 2004). Além das selectinas, as galectinas provavelmente são as lectinas animais mais descritas e caracterizadas por interagirem com estruturas contendo β -galactosídeos presentes tanto em superfícies celulares quanto em matrizes extracelulares (DODD E DRICKAMER, 2001; Sharon e Lis, 2004; ADVEDISSIAN et al., 2015). As galectinas estão relacionadas aos mais diversos processos, como adesão celular, organização e estabilização de domínios de membrana, sinalização celular, endereçamento intracelular, cicatrização, apoptose, regulação do ciclo celular, entre outros, e representam potenciais alvos terapêuticos, especialmente no câncer e doenças inflamatórias (ADVEDISSIAN et al., 2015; CAU E GUO, 2016).

Atualmente, as THIJSEN et al., 2015). galectinas têm demonstrado um papel regulatório sobre a angiogênese tumoral (GRIFFIOEN E THIJSEN, 2014; Os efeitos das galectinas sobre a angiogênese estão relacionados à sua interação com glicoproteínas presentes no microambiente tumoral, como as proteínas da matriz extracelular, que permitem a adesão das células endoteliais em um determinado tecido ou órgão (GRIFFIOEN E THIJSEN, 2014). Glinskii et al. (2004) relataram que a ativação das células endoteliais para a formação de novos vasos ocorre em resposta à presença de determinados carboidratos, geralmente

mais expressos na superfícies de células tumorais. Dessa forma, a inibição de tais carboidratos, por exemplo, representa um promissor alvo terapêutico no controle e tratamento metastático (GLINSKII et al., 2004). Galectinas também participam da sinalização celular associada ao desenvolvimento da angiogênese por meio da regulação da expressão de fatores de crescimento, como fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), mostrando-se como eficientes moduladores da angiogênese (GRIFFIOEN E THIJSEN, 2014; AHMED E ALSADEK, 2015).

Visto que um dos efeitos mais notórios das galectinas é a modulação das respostas imune e inflamatória, a ação antiparasitária de galectinas também tem sido amplamente investigada, principalmente sobre *Toxoplasma gondii* (BERNARDES et al., 2006; ALVES et al., 2010; 2013). Por exemplo, Galectina-3 aumenta a resposta inflamatória em camundongos infectados por *T. gondii*, desempenhando papéis protetor e regulatório, sobretudo no estágio inicial da infecção, provavelmente devido às propriedades antiapoptóticas exercidas pela Galectina-3, assim como em detrimento de sua capacidade de controlar a produção de citocinas, especialmente aquelas relacionadas ao perfil Th1 (BERNARDES et al., 2006; ALVES et al., 2010; 2013). Tais estratégias estão relacionadas a um possível controle da doença induzido por Galectina-3, considerando-se que camundongos *knockout* para Galectina-3 apresentaram menores taxas de sobrevivência quando comparados com aqueles que produzem Galectina-3 (ALVES et al., 2013). Fichorova et al. (2016) também evidenciaram uma redução da sobrevivência de *Trichomonas vaginalis* em animais *knockout* para galectina-3 e galectina-1. Tais relatos sugerem uma potencial aplicação dessas lectinas no *design* de fármacos para doenças autoimunes, inflamatórias e parasitárias (BERNARDES et al., 2006).

Estudos recentes também relataram a capacidade fagocitária de galectinas isoladas dos mais diversos animais contra diferentes patógenos, abrindo um caminho promissor para novas investigações acerca das propriedades antiparasitárias dessas lectinas ligantes de β -D-galactosídeos (VASTA et al. 2015; FICHOROVA et al., 2016; THULASITHA et al., 2016). Por exemplo, a ação de galectinas sobre *Trypanosoma cruzi* também tem sido bastante investigada

atualmente, devido ao aumento de sua expressão em locais de invasão parasitária, atuando como um marcador da lise do fagolisossomo nessa doença, devido ao acúmulo de galectina em torno dos parasitos após evadirem do vacúolo parasitóforo (MACHADO et al., 2014; PONCINI et al., 2015).

As lectinas tipo-C constituem, portanto, o principal grupo de lectinas, cujas funções biológicas foram pesquisadas. Suas ações têm sido amplamente demonstradas, principalmente sobre os sistemas imune e nervoso, agregação plaquetária, coagulação sanguínea, canais iônicos, entre outros (KOŃSKA et al., 2008; CLEMETSON, 2010; GOMES FILHO et al., 2014). Estas proteínas apresentam potenciais clínico-terapêuticos principalmente relacionados ao transplante de células, a ações bactericida, antiparasitária e antitumoral, além de serem utilizadas no mapeamento de neoplasias e na entrega sistêmica de fármacos (KOŃSKA et al., 2008; JAIN et al., 2012; CHRISTIE et al., 2014; GOMES FILHO et al., 2014; WANG et al., 2014).

1.2 Lectinas de peçonhas de serpentes (Snaclecs)

A primeira evidência de atividade ligante de carboidratos possivelmente ocorreu por peçonhas de serpentes que aglutinavam eritrócitos e leucócitos (FLEXNER E NOGUCHI, 1902). Entretanto, a primeira lectina isolada de peçonhas de serpentes ocorreu muitas décadas depois por Gartner e colaboradores (1980), que isolaram e caracterizaram a Trombolectina de *Bothrops atrox*. Lectinas de peçonhas de serpentes pertencem à classe das lectinas tipo-C, são chamadas de Snaclecs (do inglês, *Snake venom C-type lectins*) e são divididas em lectinas tipo-C verdadeiras, que são aquelas que se ligam a carboidratos, e lectinas tipo-C-like (CLEMETSON et al., 2009).

As lectinas tipo-C verdadeiras geralmente reconhecem β -galactosídeos, sendo essa atividade dependente de Ca^{2+} (SARTIM E SAMPAIO, 2015). Apresentam-se como estruturas homodiméricas, compostas por subunidades de 14 a 16 kDa, com 110 a 135 resíduos de aminoácidos, possuindo identidade de 82 a 97% em sua estrutura primária (DRICKAMER, 1992; SILVA et al., 2008; SARTIM E SAMPAIO, 2015). Excepcionalmente, Earl e colaboradores (2011) relataram uma lectina ligante de manose, isolada da peçonha de *Oxyuranus*

scutellatus. Recentemente, uma nova nomenclatura foi introduzida por Sartim e Sampaio (2015), que designaram lectinas verdadeiras como SVgallLs, do inglês, *Snake Venom galactose-binding Lectins* (lectinas de peçonhas de serpentes ligantes de galactose).

As SVgallLs podem formar oligômeros em solução, sobretudo em condições fisiológicas, possibilitando uma multivalente ligação a glicoconjugados presentes em superfícies dos mais diversos tipos celulares (HIRABAYASHI et al., 1991; WALKER et al., 2004; SILVA et al., 2008; SARTIM E SAMPAIO, 2015). As subunidades são ligadas por interações dissulfeto, em que cada subunidade apresenta um domínio de reconhecimento ao carboidrato (CRD) em sua estrutura (CLEMETSON, 2010). Estruturalmente, o CRD de lectinas é definido pela existência da tríade QPD (Glutamina-Prolina-Aspartato) na posição 96-97-98 que são determinantes para a especificidade para β -galactosídeos, sendo essa interação mediada por cálcio (DRICKAMER, 1992; SARTIM E SAMPAIO, 2015).

SVgallLs também apresentam em sua estrutura um loop ligante de cálcio que está envolvido tanto na interação entre as subunidades da lectina, quanto na formação do CRD (ABREU et al., 2006). A figura 1 mostra a estrutura do sítio de interação com carboidrato da lectina de *Crotalus atrox* (RSL), em que pode-se observar a presença dos resíduos Glu104, Asn119, Asp98 e Asp120, os quais participam da interação com o cálcio e o açúcar. A interação da galactose presente na lactose ocorre por meio dos grupos hidroxil do açúcar nas posições 3 e 4, que formam interações de hidrogênio com os resíduos Gln96, Asp98, Glu104 e Asn119 da proteína, além da participação de Tyr120 e Gln121, que também interagem com outras porções da galactose, conforme determinado por Walker e colaboradores (2004) (Fig. 2).

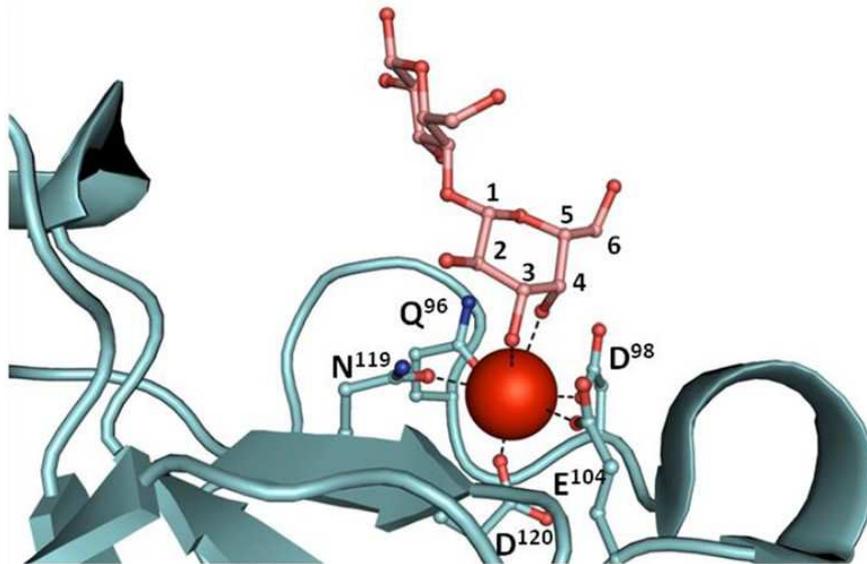


Figura 1: Representação estrutural do domínio de reconhecimento ao carboidrato (CRD) da lectina de *Crotalus atrox* (RSL) interagindo com a lactose e o cálcio, representados por bastão e esfera vermelhos, respectivamente. Alguns resíduos de aminoácidos que participam dessas interações também estão destacados (Retirado de SARTIM E SAMPAIO, 2015).

A estrutura primária de SVgallNs é caracterizada também pela presença de oito ou nove resíduos de cisteína, altamente conservados, que estão associados à formação de pontes dissulfeto inter e intracadeias (HIRABAYASHI et al., 1991; ABREU et al., 2006). A presença dessas pontes dissulfeto pode estar relacionada a uma proteção das lectinas contra a degradação por proteases abundantes em peçonhas ofídicas, assim como mantém a estabilidade dessas lectinas quando em contato com o sangue e fluidos corporais das presas (HIRABAYASHI et al., 1991). Além das pontes dissulfeto, interações eletrostáticas, como pontes salinas e interações de hidrogênio também contribuem para a estabilização estrutural de SVgallNs, possibilitando principalmente a interação entre os monômeros (SARTIM E SAMPAIO, 2015).

Outros resíduos bastante conservados são aqueles também presentes em lectinas tipo-C isoladas de outros animais, como Leu40, Trp67, Gly69, Trp81, Trp92, Pro97, Asp120, entre outros, sendo que alguns deles não estão

diretamente envolvidos na ligação aos carboidratos-alvo, mas podem auxiliar na estabilização estrutural necessária para a ligação de cálcio (HIRABAYASHI et al.,1991). A lectina RSL, uma das primeiras SVgalLs a ter sua estrutura tridimensional elucidada, possui um núcleo hidrofóbico, característico de lectinas tipo-C em geral, que é estabilizado pela formação das conservadas pontes dissulfeto (HIRABAYASHI et al.,1991; WALKER et al., 2004). Os autores também demonstraram que tal lectina apresenta uma abundância de resíduos hidrofílicos, como aspartato, glutamato e glicina (HIRABAYASHI et al.,1991).

Análises estruturais de SVgalLs são realizadas baseadas no cristal obtido de RSL, a única lectina com estrutura tridimensional completa elucidada até o momento (WALKER et al., 2004). Com relação à estrutura secundária, a maioria das lectinas tipo-C verdadeiras possuem duas α -hélices e seis folhas- β conservadas (ABREU et al., 2006). Algumas variações na proporção dessas estruturas já foram relatadas para a SVgalLs de *C. atrox* (RSL) e *Bothrops jararacussu* (BjcuL), porém a predominância de folhas β -pregueadas é uma característica comum (ARAGÓN-ORTÍZ et al., 1989; WALKER et al., 2004; SILVA et al., 2008; SARTIM E SAMPAIO, 2015). A figura 2 mostra a predominância de folhas- β no monômero de RSL, que também apresenta em sua estrutura um loop alternativo ligante de íons, também crucial para a sua estabilização estrutural (WALKER et al., 2004):

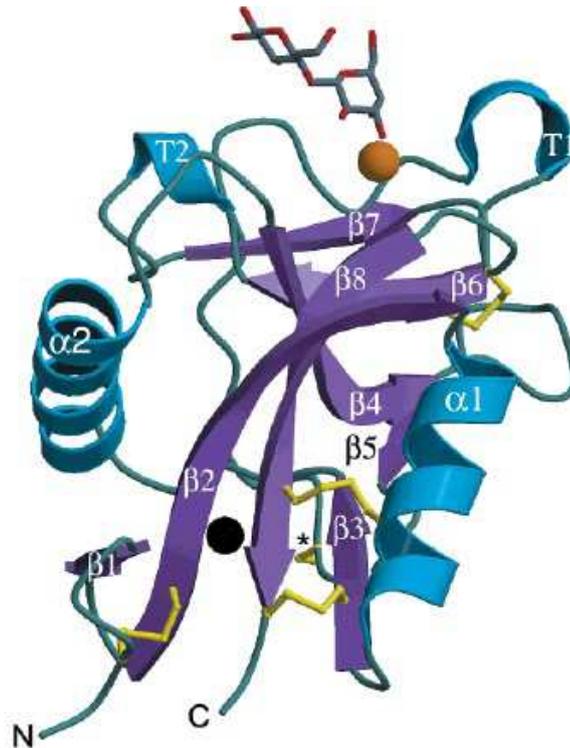


Figura 2: Diagrama de fitas do monômero de RSL, em que as α -hélices estão coloridas em azul, as folhas- β em roxo e as cadeias laterais dos resíduos de cisteína representados por bastões amarelos. O asterisco mostra a Cys86, envolvida na interação dissulfeto entre os monômeros. Íons sódio e cálcio estão representados por esferas de cores preta e laranja, respectivamente, enquanto a lactose está mostrada por bastões cinza e vermelho (Retirado de WALKER et al., 2004).

Por sua vez, lectinas tipo-C like de peçonhas de serpentes apresentam um CRD incompleto, levando à perda da atividade hemaglutinante característica das SVgallLs; porém apresentando outras atividades biológicas como efeitos pró- e anticoagulantes (MORITA, 2005a; ABREU et al., 2006). Contrariamente às SVgallLs, lectinas-like são heterodiméricas, compostas por uma subunidade α (cadeia A) de 14-15 kDa e uma subunidade β (cadeia B) de 13-14 kDa, podendo assumir formas oligoméricas, além de serem mais abundantes (MORITA, 2005b; ZELENSKY E GREARY, 2005; ARLINGHAUS E EBLE, 2012). Além disso, lectinas-like são caracterizadas pela presença de uma superfície côncava entre as subunidades, que provavelmente representa a região ligante de alvos nessas proteínas, assim como apresentam um longo loop nessa região (MORITA, 2005b;

SAJEVIC et al., 2011). Algumas lectinas-like não dependem de cálcio para a sua atividade e essa característica parece estar relacionada ao resíduo de aminoácido presente na posição 120, de modo que a presença de uma lisina leva a uma perda na interação com o cálcio (MORITA, 2005b). Por sua vez, a presença de glutamato (Glu120) pode estar relacionada a uma dependência de cálcio para a atividade de lectinas-like (MORITA, 2005b).

Em peçonhas ofídicas, lectinas-like são muito importantes também na composição de outras toxinas, como as metaloproteases, que possuem domínios lectinas-like em sua estrutura ligados por pontes dissulfeto (MORITA, 2005b; FOX E SERRANO, 2008). Devido a suas características funcionais, as lectinas-like auxiliaram na elucidação de mecanismos envolvendo ativação da coagulação e de plaquetas, assim como na determinação da relação estrutura-função de fatores da coagulação sanguínea e de glicoproteínas plaquetárias humanas (MORITA, 2005b).

As lectinas isoladas de peçonhas ofídicas exercem diversas funções de interesse farmacológico (MORITA, 2005a; CLEMETSON, 2010; ARLINGHAUS E EBLE, 2012). Uma de suas aplicações inclui a participação na modulação da resposta imune e, conseqüentemente, na inflamação, envolvendo a participação de diversas células do sistema imune, como macrófagos e neutrófilos, assim como na produção de citocinas por essas células (ELIFIO-ESPOSITO et al., 2011; Dias-Netipanyi et al., 2016). Por exemplo, BjcUL, uma SVgAL isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*, é capaz de ativar neutrófilos, estimulando várias funções imunes, como tráfego celular e indução de resposta imune inata (ELIFIO-ESPOSITO et al., 2011). Ainda mais, BjcUL também aumenta a adesão desses neutrófilos a proteínas da matrix extracelular, como fibronectina e também ao substrato Matrigel (ELIFIO-ESPOSITO et al., 2011).

Recentemente, Dias-Netipanyi e colaboradores (2016) mostraram que BjcUL ativa macrófagos, induzindo resposta fagocitária e produção de citocinas pró-inflamatórias. De acordo com os autores, a estimulação da resposta inflamatória por BjcUL pode amplificar os efeitos antitumorais desencadeados pela mesma toxina, mostrando-se uma ferramenta versátil para o tratamento de diferentes distúrbios (DIAS-NETIPANYI et al., 2016). Galatrox, isolada da peçonha de *Bothrops atrox* possui propriedades semelhantes à BjcUL, porém liga-

se a unidades de N-acetil-D-lactosamina presentes em proteínas da matriz extracelular, modulando a atividade de neutrófilos e estimulando a liberação de mediadores pró-inflamatórios (SARTIM et al., 2014). A ativação de neutrófilos e macrófagos por B₂gal₄ provavelmente envolve o reconhecimento de carboidratos presentes na superfície dessas células, mas os autores sugerem que o entendimento de mecanismos intracelulares mais específicos é necessário para investigações futuras sobre as aplicações terapêuticas dessa lectina sobre células do sistema imune inato (ELIFIO-ESPOSITO et al., 2011; DIAS-NETIPANYI et al., 2016). De forma geral, assim como lectinas de outras fontes, SVgal₄s induzem mitogênese celular por meio do reconhecimento de açúcares presentes na superfície destas células, desencadeando uma transdução de sinal (SHARON E LIS, 2004; SARTIM E SAMPAIO, 2015). Por sua vez, os efeitos inflamatórios induzidos por SVgal₄s são decorrentes do influxo de neutrófilos ao local de inflamação promovido por uma interação direta entre lectinas e a matrix extracelular e/ou pela estimulação de macrófagos residentes ou mastócitos que levam a expressão de mediadores amplificadores da inflamação (SARTIM E SAMPAIO, 2015).

Lectinas de peçonhas ofídicas também são correlacionadas com aplicações antitumorais devido a sua capacidade de inibir adesão, migração, proliferação e invasão de várias linhagens de células tumorais, além de apresentarem um promissor efeito antiangiogênico *in vivo* e *in vitro* (SARRAY et al., 2008; JEBALI et al., 2014; DHANANJAYA E SIVASHANKARI, 2015). Assim, essas lectinas atuam sobre células tumorais promovendo apoptose, além de restringirem o fornecimento de nutrientes pela corrente sanguínea ao inibir a neovascularização por meio do bloqueio de integrinas presentes nas membranas das células endoteliais, levando a consequente morte das células tumorais (DAMASIO et al., 2014; DHANANJAYA E SIVASHANKARI, 2015). Mais especificamente, alguns eventos associados à atividade antitumoral de SVgal₄s tem sido demonstrados, como desorganização do citoesqueleto celular, ativação da cascata de sinalização das caspases, aumento das concentrações de cálcio citosólico, geração de superóxidos mitocondriais e transição na permeabilidade da membrana mitocondrial (NOLTE et al., 2012; ARANDA-SOUZA et al., 2014; DAMASIO et al., 2014).

Estudos acerca da ação de SVgallS sobre novos alvos mostram-se bastante promissores, em decorrência do amplo reconhecimento de lectinas sobre vários tipos celulares, sobretudo considerando-se que muitos patógenos aderem à célula hospedeira por meio de interações proteína-carboidratos (HAMID et al., 2013; MCCLEARY E KINI, 2013; DHANANJAYA E SIVASHANKARI, 2015, SARTIM E SAMPAIO, 2015; DIAS-NETIPANYI et al., 2016). Nesse contexto, um campo de estudos emergente é a ação anti-parasitária dessas lectinas, uma vez que a busca por novos componentes de fontes naturais tem sido amplamente utilizada para promover o tratamento de algumas parasitoses (FERNANDES et al., 2010). Dessa forma, algumas lectinas têm sido utilizadas no controle parasitário e na identificação de antígenos parasitários, especialmente em *Toxoplasma gondii* (LUO et al., 2011; CASTANHEIRA et al., 2015; HARITO et al., 2016; WANG et al., 2016). Entretanto, estudos relacionando a identificação de alvos parasitários por lectinas e possíveis alterações na progressão da doença causadas por lectinas ainda são alvos de investigações futuras, evidenciando um interessante campo em aberto para estudos com SVgals.

Nosso grupo de pesquisas vem demonstrando o potencial antiparasitário de algumas toxinas ofídicas (BASTOS et al., 2008; CASTANHEIRA et al., 2013; 2015; NUNES et al., 2013; BORGES et al., 2016). Com relação às lectinas, Castanheira et al. (2013) mostraram que BpLec, isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*, reconhece possíveis alvos nas superfícies de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Staphylococcus aureus*. Mais recentemente, Castanheira et al. (2015) mostraram o efeito anti-parasitário de BpLec sobre *Toxoplasma gondii*, em que a toxina diminuiu o parasitismo de formas taquizoítas desse parasito, sem alterar a viabilidade celular, porém reduzindo as taxas de adesão e proliferação do parasito em sua célula hospedeira. Esse efeito anti-parasitário induzido por BpLec também foi corroborado por um aumento na produção de IL-6 e diminuição na produção de TGF- β 1, marcadores inflamatórios característicos no controle da doença pelo hospedeiro.

Dessa forma, Snaclecs apresentam uma ampla aplicação tanto no entendimento de algumas doenças, como em seu tratamento e diagnóstico. Muitas outras aplicações ainda estão sob uma investigação mais minuciosa e

revelam grandes perspectivas acerca de novas descobertas por estudos com essas proteínas, que representam um emergente campo da Toxinologia.

1.3 BpLec: uma lectina tipo-C isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*

A peçonha de *B. pauloensis* tem sido bastante explorada por nosso grupo de pesquisa e dentre os compostos já isolados, encontram-se quatro fosfolipases A₂ básicas e uma fosfolipase A₂ ácida (RODRIGUES et al., 1998; 2004; 2007; FERREIRA et al., 2013), três metaloproteases (NAVES DE SOUZA et al., 2012; ACHÊ et al., 2015; GOMES et al., 2015), uma serinoprotease (COSTA et al., 2009), uma L-aminoácido oxidase (RODRIGUES et al. 2009), e uma lectina tipo-C (CASTANHEIRA et al., 2013). O estudo dessas toxinas permite não somente um entendimento sobre a patofisiologia do envenenamento, mas contribui também para o desenvolvimento de drogas utilizadas no tratamento de várias doenças (MCCLEARY E KINI, 2013; RODRIGUES et al., 2015).

BpLec é uma lectina tipo-C isolada da peçonha de *B. pauloensis*, a qual representa apenas 0,5% da composição proteica da peçonha total (CASTANHEIRA et al., 2013). Os autores neste estudo demonstraram algumas características químicas e biológicas dessa toxina, facilmente isolada por meio de dois processos cromatográficos, que consistem em uma cromatografia de afinidade em resina de D-galactose, seguida de uma cromatografia de exclusão molecular. Com relação às características químicas, a proteína apresenta um ponto isoelétrico de 5,36 e massa molecular de 33,6 kDa que indica glicosilação de BpLec. A estrutura primária parcial de BpLec revelou sua composição por 132 resíduos de aminoácidos para cada subunidade, que incluem resíduos ácidos, altamente conservados entre as SVgaLs, que caracterizam a superfície negativamente carregada presente em várias lectinas de peçonhas ofídicas (ABREU et al., 2006).

BpLec também apresenta em sua estrutura o domínio de reconhecimento ao carboidrato (CRD) característico dessa classe de toxinas, que geralmente é representado por três resíduos de aminoácidos clássicos (Gln96-Pro97-Asp98) presentes na porção C-terminal da toxina (DRICKAMER, 1988; ABREU et al., 2006, CASTANHEIRA et al., 2013). Por fim, BpLec possui em sua estrutura

primária nove resíduos de cisteínas importantes para a manutenção de sua estabilidade conformacional, conservados também na estrutura de outras lectinas (CASTANHEIRA et al., 2013).

A atividade funcional de BpLec foi avaliada por ensaio de hemaglutinação utilizando-se eritrócitos de diferentes animais, de modo que eritrócitos de cão e gato foram aglutinados por baixas concentrações de BpLec. A atividade hemaglutinante de BpLec foi inibida por β -galactosídeos, como D-galactose, D-lactose e N-acetil-D-galactosamina, assim como também foi inibida por EDTA, demonstrando a dependência de BpLec por cátions divalentes para executar sua atividade biológica. Temperaturas acima de 60°C foram capazes de reduzir a atividade proteica sobre eritrócitos de cão, enquanto nenhum valor de pH testado alterou a mesma atividade (CASTANHEIRA et al., 2013).

BpLec inibiu o crescimento da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, mas não teve efeitos sobre o crescimento de *Escherichia coli*, uma bactéria Gram-negativa (CASTANHEIRA et al., 2013). O mesmo foi evidenciado para BIL, uma lectina isolada da peçonha de *Bothrops leucurus*, de modo que os autores sugerem que essas lectinas não conseguem ultrapassar a membrana externa de bactérias Gram-negativas para alcançarem o espaço periplasmático e, por isso, não apresentam efeitos sobre tais bactérias (NUNES et al., 2011). Ainda com relação às características funcionais de BpLec, a toxina não apresentou citotoxicidade sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, mas foi capaz de aglutinar as mesmas, sendo esta atividade inibida também por β -D-galactosídeos, sugerindo um possível reconhecimento de glicoconjugados presentes na membrana do parasito por BpLec (CASTANHEIRA et al., 2013).

Considerando-se os resultados promissores apresentados nesse estudo preliminar, novos trabalhos são de grande interesse para investigar a contribuição funcional de BpLec nos mais diversos processos biológicos e possíveis aplicações dessa toxina. Neste contexto, apresentamos a ação antiparasitária de BpLec sobre formas taquizoítas de *Toxoplasma gondii* e, adicionalmente, devido aos emergentes estudos relacionados a ação de Snaclecs sobre células endoteliais, também demonstramos os efeitos de BpLec sobre angiogênese *in vitro* e *in vivo*.

1.4. Referências bibliográficas

ABREU, P. A.; ALBUQUERQUE, M. G.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Structure-function inferences based on molecular modeling, sequence-based methods and biological data analysis of snake venom lectins. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**. v. 48, p. 690-701, 2006.

ACHÊ, D.C.; GOMES, M. S.; DE SOUZA, D.L.; SILVA, M.A.; BRANDEBURGO, M.I.; YONEYAMA, K.A.; RODRIGUES, R.S.; BORGES, M.H.; LOPES, D.S.; RODRIGUES, V.DE M. Biochemical properties of a new PI SVMMP from *Bothrops pauloensis*: inhibition of cell adhesion and angiogenesis. **Int J Biol Macromol**. v. 72, p. 445-53, 2015.

ADVEDISSIAN, T.; DESHAYES, F.; POIRIER, F.; GRANDJEAN, C.; VIGUIER, M. Galectins, a class of unconventional lectins. **Med Sci (Paris)**. v. 31, p. 499-505, 2015.

AGRAWAL, B. B.; GOLDSTEIN, I. J. Protein-carbohydrate interaction. VI. Isolation of concanavalin A by specific adsorption on cross-linked dextran gels. **Biochim Biophys Acta**. v. 147, p. 262-71, 1967.

AHMED, H.; ALSADEK, D.M. Galectin-3 as a Potential Target to Prevent Cancer Metastasis. **Clin Med Insights Oncol**. v. 25; p. 113-21, 2015.

AKAHANI, S.; NANGIA-MAKKER, P.; INOHARA, H.; KIM, H. R.; RAZ, A. Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. **Cancer Res**. v. 57, p. 5272-6, 1997.

ALVES, C. M.; SILVA, D. A.; AZZOLINI, A. E.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; CARVALHO, J. V.; PAJUABA A. C.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; CHAMMAS, R.; LIU, F. T.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; MINEO, J. R. Galectin-3 plays a

modulatory role in the life span and activation of murine neutrophils during early *Toxoplasma gondii* infection. **Immunobiology**. v. 215, p. 475-85, 2010.

ALVES, C. M.; SILVA, D. A.; AZZOLINI, A.E.; MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; MINEO, J. R. Galectin-3 is essential for reactive oxygen species production by peritoneal neutrophils from mice infected with a virulent strain of *Toxoplasma gondii*. **Parasitology**. v. 140, p. 210-9, 2013.

ANGATA, T.; BRINKMAN-VAN DER LINDEN, E. I-type lectins. **Biochim Biophys Acta**. v. 1572, nº 2-3, p. 294-316. 2002.

ARAGÓN-ORTÍZ, F.; BRENES-BRENES, J. R.; GUBENSEK, F. Characterization of a lectin-like protein isolated from *Lachesis muta* snake venom. **Rev Biol Trop**. v. 37, nº 1, p. 79-83, 1989.

ARANDA-SOUZA, M. A.; ROSSATO, F. A.; COSTA, R. A.; FIGUEIRA, T. R.; CASTILHO, R. F.; GUARNIERE, M. C.; NUNES, E. S.; COELHO, L. C.; CORREIA, M. T.; VERCESI, A. E. A lectin from *Bothrops leucurus* snake venom raises cytosolic calcium levels and promotes B16-F10 melanoma necrotic cell death via mitochondrial permeability transition. **Toxicon**. v. 82, p. 97-103, 2014.

ARLINGHAUS, F. T.; EBLE, J. A. C-type lectin-like proteins from snake venoms. **Toxicon**. v. 60, nº 4, p. 512-9, 2012.

BASTOS, L. M.; JÚNIOR, R. J.; SILVA, D. A.; MINEO, J. R.; VIEIRA, C. U.; TEIXEIRA, D. N.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; RODRIGUES, V. M.; HAMAGUCHI, A. *Toxoplasma gondii*: effects of neuwiedase, a metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* snake venom, on the invasion and replication of human fibroblasts in vitro. **Exp Parasitol**. v. 120, nº 4, p. 391-6, 2008.

BERNARDES, E. S.; SILVA, N. M.; RUAS, L. P.; MINEO, J. R.; LOYOLA, A. M.; HSU, D. K.; LIU, F. T.; CHAMMAS, R.; ROQUE-BARREIRA, M. C. *Toxoplasma*

gondii infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity. **Am J Pathol.** v. 168, nº 6, p. 1910-20, 2006.

BORGES, I. P.; CASTANHEIRA, L. E.; BARBOSA, B. F.; DE SOUZA, D. L.; DA SILVA, R. J.; MINEO, J. R.; TUDINI, K. A.; RODRIGUES, R. S.; FERRO, E. A.; DE MELO RODRIGUES, V. Anti-parasitic effect on *Toxoplasma gondii* induced by BnSP-7, a Lys49-phospholipase A₂ homologue from *Bothrops pauloensis* venom. **Toxicon.** v. 119, p. 84-91, 2016.

BOYD, W. C.; SHAPLEIGH, E. Specific Precipitating Activity of Plant Agglutinins (Lectins). **Science**, v. 119, p. 419, 1954.

CASTANHEIRA, L.; NAVES DE SOUZA, D.L.; SILVA, R.J.; BARBOSA, B., MINEO, J.R.; TUDINI, K.A.; RODRIGUES, R.; FERRO, E.V.; DE MELO RODRIGUES, V. Insights into anti-parasitism induced by a C-type lectin from *Bothrops pauloensis* venom on *Toxoplasma gondii*. **Int J Biol Macromol.** v. 74, p. 568-74, 2015.

CASTANHEIRA, L. E.; NUNES, D. C.; CARDOSO, T. M.; SANTOS, P. DE S.; GOULART, RODRIGUES, R. S.; RICHARDSON, M.; BORGES, M. H.; YONEYAMA, K. A.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and functional characterization of a C-type lectin (BpLec) from *Bothrops pauloensis* snake venom, **Int J Biol Macromol.** v. 54, p. 57-64, 2013.

CAO, Z. Q.; GUO, X. L. The role of galectin-4 in physiology and diseases. **Protein Cell.** v. 7, p. 314-324, 2016.

CHRISTIE, M. P.; TOTH, I.; SIMERSKÁ, P. Biophysical characterization of lectin-glycan interactions for therapeutics, vaccines and targeted drug-delivery. **Future Med Chem.** v. 6, nº 18, p. 2113-29, 2014.

CLEMETSON, K. J.; MORITA, T.; MANJUNATHA KINI, R. Registry of Exogenous Hemostatic Factors of SSC of the ISTH. Scientific and standardization committee

communications: classification and nomenclature of snake venom C-type lectins and related proteins. **J Thromb Haemost.** v. 7., nº 2, p. 360, 2009.

CLEMETSON, K. J. Snaclecs (snake C-type lectins) that inhibit or activate platelets by binding to receptors. **Toxicon.** v. 56, nº 7, p. 1236–46., 2010.

COSTA, F. L.; RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F.; MENALDO, D. L.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FULY, A. L.; SOARES, S. G.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; BARRAVIERA, B.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and functional properties of a thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon.** v. 54, p. 725-35, 2009.

CROCKER, P. R.; CLARK, E. A.; FILBIN, M.; GORDON, S.; JONES, Y.; KEHRL, J. H.; KELM, S.; LE DOUARIN, N.; POWELL, L.; Roder, J.; SCHNAAR, R. L.; SGROI, D.C.; STAMENKOVIC, K.; SCHAUER, R.; SCHACHNER, M.; VAN DEN BERG, T. K.; VAN DER MERWE, P. A.; WATT, S. M.; VARKI, A. Siglecs: a family of sialic-acid binding lectins. **Glycobiology.** v. 8, nº 2, p. v-vi, 1998.

CUMMINGS, R. D.; ETZLER, M. E. R-type Lectins. In: VARKI, A.; CUMMINGS, R. D.; ESKO, J. D.; FREEZE, H. H.; STANLEY, P.; BERTOZZI, C. R.; HART, G. W.; ETZLER, M. E. **Essentials of Glycobiology.** 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2009.

DAMASIO, D. de C.; NOLTE, S.; POLAK, L. P.; BRANDT, A. P.; BONAN, N. B.; ZISCHLER, L.; STUELP-CAMPELO, P. M.; CADENA, S. M.; NORONHA, L. D.; ELÍFIO-ESPOSITO, S. L.; MORENO-AMARAL, A. N. The lectin BJcuL induces apoptosis through TRAIL expression, caspase cascade activation and mitochondrial membrane permeability in a human colon adenocarcinoma cell line. **Toxicon.** v. 90, p. 299-307, 2014.

.

DAMBUZA, I. M.; BROWN, G. D. C-type lectins in immunity: recent developments. **Curr Opin Immunol.** v. 32, p. 21-7, 2015.

DAN, X.; LIU, W.; NG, T. B. Development and Applications of Lectins as Biological Tools in Biomedical Research. **Med Res Rev.** v. 36, n° 2, p. :221-47, 2016.

DHANANJAYA, B. L.; SIVASHANKARI, P. R. Snake venom derived molecules in tumor angiogenesis and its application in cancer therapy; an overview. **Curr Top Med Chem.**v. 15, n° 7, p. 649-57, 2015.

DIAS-NETIPANYI, M. F.; BOLDRINI-LEITE, L. M.; TRINDADE, E. S.; MORENO-AMARAL, A. N.; ELIFIO-ESPOSITO, S. B. A snake venom lectin, modulates monocyte-derived macrophages to a pro-inflammatory profile In Vitro. **Toxicol In Vitro.** v. 2333, n° 16, p. 30037-6, 2016.

DODD, R. B.; DRICKAMER, K. Lectin-like proteins in model organisms: implications for evolution of carbohydrate-binding activity. **Glycobiology.** v. 11, n° 5, p. 71R-9R, 2001.

DRICKAMER, K. Engineering galactose-binding activity into a C-type mannose-binding protein. **Nature.** v. 360, n° 6400, p. 183-6, 1992.

DRICKAMER, K. Recognition of complex carbohydrates by Ca⁽²⁺⁾-dependent animal lectins. **Biochem Soc Trans.** v. 21, n 2, p. 456-9, 1993.

DRICKAMER, K.; TAYLOR, M. E. Biology of animal lectins. **Annu Rev Cell Biol.** v. 9, p. :237-64, 1993.

DRICKAMER, K.; TAYLOR, M. E. Recent insights into structures and functions of C-type lectins in the immune system. **Curr Opin Struct Biol.** v. 34, p. 26-34, 2015.

DRICKAMER, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. **J Biol Chem.** v. 263, n° 20, p. 9557-60, 1988.

EARL, S. T.; ROBSON, J.; TRABI, M.; de JERSEY, J.; MASCI, P. P.; LAVIN, M. F. Characterisation of a mannose-binding C-type lectin from *Oxyuranus scutellatus* snake venom. **Biochimie**. v. 93, n° 3, p. 519-27, 2011.

EDELMAN, G. M.; CUNNINGHAM, B. A.; REEKE, G. N. JR.; BECKER, J. W.; WAXDAL, M. J.; WANG, J. L. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 69, n° 9, p. 2580-4, 1972.

ELIFIO-ESPOSITO, S.; TOMAZELI, L.; SCHWARTZ, C.; GIMENEZ, A. P.; FUGII, G. M.; FERNANDES, L. C.; ZISHLER, L. F.; STUELP-CAMPELO, P. M.; MORENO, A. N. Human neutrophil migration and activation by BJcuL, a galactose binding lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom. **BMC Immunol**. v. 12, p. 10, 2011.

FERNANDES, M. P.; INADA, N. M.; CHIARATTI, M. R.; ARAÚJO, F. F.; MEIRELLES, F. V.; CORREIA, M. T.; COELHO, L. C.; ALVES, M. J.; GADELHA, F. R.; VERCESI, A. E. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin. **J Bioenerg Biomembr**. v. 42, n° 1, p. 69-78, 2010.

FERREIRA, F. B.; GOMES, M. S.; DE SOUZA, D. L.; GIMENES, S. N.; CASTANHEIRA, L. E.; BORGES, M. H.; RODRIGUES, R. S.; YONEYAMA, K. A.; BRANDEBURGO, M. I.; RODRIGUES, V. M. Molecular cloning and pharmacological properties of an acidic PLA2 from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxins (Basel)**. v. 5, p. 2403-19, 2013.

FICHOROVA, R.N.; YAMAMOTO, H. S.; FASHEMI, T.; FOLEY, E.; RYAN, S.; BEATTY, N.; DAWOOD, H.; HAYES, G. R.; ST-PIERRE, G.; SATO, S.; SINGH, B. N. *Trichomonas vaginalis* Lipophosphoglycan Exploits Binding to Galectin-1 and -3 to Modulate Epithelial Immunity. **J Biol Chem**. v. 291, n° 2, p. 998-1013, 2016.

FLEXNER, S.; NOGUCHI, H. Snake Venom in relation to haemolysis, bacteriolysis and toxicity. **J Exp Med**. v. 6, n° 3, p. 277-301, 1902.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS J.** v. 275, nº 12, p. 3016-30, 2008.

GARDÈRES, J.; BOURGUET-KONDRACKI, M. L.; HAMER, B.; BATEL, R.; SCHRÖDER, H. C.; MÜLLER, W. E. Porifera Lectins: Diversity, Physiological Roles and Biotechnological Potential. **Mar Drugs.** v. 13, nº 8, p. 5059-101, 2015.

GARTNER, T. K.; STOCKER, K.; WILLIAMS, D. C. Thrombolectin: a lectin isolated from *Bothrops atrox* venom. **FEBS Letters.** v. 117, p. 13–16, 1980.

GLINSKII, O. V.; TURK, J. R.; PIENTA, K. J.; HUXLEY, V. H.; GLINSKY, V. V. Evidence of porcine and human endothelium activation by cancer-associated carbohydrates expressed on glycoproteins and tumour cells. **J Physiol.** v. 554, p. 89-99, 2004.

GOMES FILHO, S. M.; CARDOSO, J. D.; ANAYA, K.; SILVA DO NASCIMENTO, E.; DE LACERDA, J. T.; MIOSO, R.; SANTI GADELHA, T.; DE ALMEIDA GADELHA, C. A. Marine sponge lectins: actual status on properties and biological activities. **Molecules.** v. 20, nº 1, p. 348-57, 2014.

GOMES, M. S.; NAVES DE SOUZA, D. L.; GUIMARÃES, D. O.; LOPES, D. S.; MAMEDE, C. C.; GIMENES, S. N.; ACHÊ, D. C.; RODRIGUES, R. S.; YONEYAMA, K. A.; BORGES, M. H.; DE OLIVEIRA, F.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and functional characterization of Bothropoidin: the first haemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops pauloensis* snake venom. **J Biochem.** v. 157, nº 3, p. 137-49, 2015.

GRIFFIOEN, A. W.; THIJSSSEN, V. L. Galectins in tumor angiogenesis. **Ann Transl Med.** v. 2, nº 9, p. 90, 2014.

HAMID, R.; MASOOD, A.; ISHFAK WANI, H.; RAFIQ, S. Lectins: Proteins with Diverse Applications. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. v. 3, p. S93-S103, 2013.

HARITO, J. B.; CAMPBELL, A. T.; PRESTRUD, K. W.; DUBEY, J. P.; ROBERTSON, L. J. Surface binding properties of aged and fresh (recently excreted) *Toxoplasma gondii* oocysts. **Exp Parasitol**. v. 165, p. 88-94, 2016.

HIRABAYASHI, J.; KUSUNOKI, T.; KASAI, K.. Complete primary structure of a galactose-specific lectin from the venom of the rattlesnake *Crotalus atrox* Homologies with Ca²⁽⁺⁾-dependent-type lectins. **J Biol Chem**. v. 266, p. 2320-6, 1991.

HU, D.; HUANG, H.; TATENO, H.; NAKAKITA, S.; SATO, T.; NARIMATSU, H.; YAO, X.; HIRABAYASHI, J. Engineering of a 3'-sulpho-Gal β 1-4GlcNAc-specific probe by a single amino acid substitution of a fungal galectin. **J Biochem**. v. 157, n^o 4, p. 197-200, 2015.

IMPELLIZZERI, D.; CUZZOCREA, S. Targeting selectins for the treatment of inflammatory diseases. **Expert Opin Ther Targets**.;v. 18, n^o 1, p. 55-67, 2014.

KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochim Biophys Acta**. v. 1572, n^o 2-3, p. 187-97, 2002.

KIM, J. J.; OLSON, L. J.; DAHMS, N. M. Carbohydrate recognition by the mannose-6-phosphate receptors. **Curr Opin Struct Biol**. v. 19, n^o 5, p. 534-42, 2009.

KISHORE, U.; EGGLETON, P.; REID. K.B.M. Modular organization of carbohydrate recognition domains in animal lectins, **Matrix Biol**. v. 15, p. 583-592, 1997.

KOŃSKA, G.; WÓJTOWICZ, U.; PITUCH-NOWOROLSKA, A. Possible application of lectins in diagnostics and therapy. Part I. Diagnostic application. **Przegl Lek.** v. 65, n° 4, p. 189-94, 2008.

JAIN, K.; KESHARWANI, P.; GUPTA, U.; JAIN, N. K. A review of glycosylated carriers for drug delivery. **Biomaterials.** v. 33, n° 16, p. 4166-86, 2012.

JEBALI, J.; FAKHFEKH, E.; MORGEN, M.; SRAIRI-ABID, N.; MAJDOUB, H.; GARGOURI, A.; EL AYEB, M.; LUIS, J.; MARRAKCHI, N.; SARRAY, S. Lebecin, a new C-type lectin like protein from *Macrovipera lebetina* venom with anti-tumor activity against the breast cancer cell line MDA-MB231. **Toxicon.** v. 86, p. 16-27, 2014.

LINDAHL-KIESSLING, K. Mechanism of phytohemagglutinin (PHA) action. V. PHA compared with concanavalin A (Con A). **Exp Cell Res.** v. 70, n° 1, p. 17-26, 1972.

LONDRIGAN, S. L.; TATE, M. D.; BROOKS, A. G.; READING, P. C. Cell-surface receptors on macrophages and dendritic cells for attachment and entry of influenza virus. **J Leukoc Biol.** v. 92, n° 1, p. 97-106, 2012.

LUO, Q.; UPADHYA, R.; ZHANG, H.; MADRID-ALISTE, C.; NIEVES, E.; KIM, K.; ANGELETTI, R. H.; WEISS, L. M. Analysis of the glycoproteome of *Toxoplasma gondii* using lectin affinity chromatography and tandem mass spectrometry. **Microbes Infect.** v. 14-15, p. 1199-210, 2011.

MACEDO, M. L.; OLIVEIRA, C.F.; OLIVEIRA CT. Insecticidal activity of plant lectins and potential application in crop protection. **Molecules.** v. 20, n° 2, p. 2014-33, 2015.

MACHADO, F. C.; CRUZ, L.; DA SILVA, A. A.; CRUZ, M. C.; MORTARA, R. A.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; DA SILVA, C. V. Recruitment of galectin-3 during cell invasion and intracellular trafficking of *Trypanosoma cruzi* extracellular amastigotes. **Glycobiology.** v. 24, n° 2, p. 179-84, 2014.

MARAKALALA, M. J.; VAUTIER, S.; POTRYKUS, J.; WALKER, L. A.; SHEPARDSON, K. M.; HOPKE, A.; MORA-MONTES, H. M.; KERRIGAN, A.; NETEA, M. G.; MURRAY, G. I.; MACCALLUM, D. M.; WHEELER, R.; MUNRO, C. A.; GOW, N. A.; CRAMER, R. A.; BROWN, A. J.; BROWN, G. D. Differential adaptation of *Candida albicans* in vivo modulates immune recognition by dectin-1. **PLoS Pathog**. v. 9, nº 4, p. e1003315, 2013.

MCCLEARY, R. J.; KINI, R. M. Non-enzymatic proteins from snake venoms: a gold mine of pharmacological tools and drug leads. **Toxicon**. v. 62, p. 56-74, 2013.

MORGAN, D. A.; RUSCETTI, F. W.; GALLO, R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. **Science**. v. 193, nº 4257, p. 1007-8, 1976.

MORITA, T. Structure-function relationships of C-type lectin-related proteins. **Pathophysiol Haemost Thromb**. v. 34, nº 4-5, p. 156-9, 2005a.

MORITA, T. Structures and functions of snake venom CLPs (C-type lectin-like proteins) with anticoagulant-, procoagulant-, and platelet-modulating activities. **Toxicon**. v. 45, nº 8, p. 1099-114, 2005b.

MOURA, R. M.; QUEIROZ, A. F.; FOOK, J. M.; DIAS, A. S.; MONTEIRO, N. K.; RIBEIRO, J. K.; MOURA, G. E.; MACEDO, L. L.; SANTOS, E. A.; SALES, M. P. CvL, a lectin from the marine sponge *Cliona varians*: Isolation, characterization and its effects on pathogenic bacteria and Leishmania promastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular and Integrative Physiology**. v. 145, p. 517-523, 2006.

NAEEM, A.; SALEEMUDDIN, M.; KHAN, R. H. Glycoprotein targeting and other applications of lectins in biotechnology. **Curr Protein Pept Sci**. v. 8, nº 3, 261-71, 2007.

NAVES DE SOUZA, D. L.; GOMES, M. S.; FERREIRA, F. B.; RODRIGUES, R. S.; ACHE, D. C.; RICHARDSON, M.; BORGES, M. H.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and enzymatic characterization of BpMP-I, a fibrinogenolytic metalloproteinase isolated from *Bothropoides pauloensis* snake venom. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.** v. 161, p. 102-9, 2012.

NOLTE, S.; DE CASTRO DAMASIO, D.; BARÉA, A. C.; GOMES, J.; MAGALHÃES, A.; MELLO ZISCHLER, L. F.; STUELP-CAMPELO, P. M.; ELÍFIO-ESPOSITO, S. L.; ROQUE-BARREIRA, M. C.; REIS, C. A.; MORENO-AMARAL, A. N. BJcuL, a lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom, induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by inhibition of cell adhesion and actin cytoskeleton disassembly. **Toxicon.** v. 59, nº 1, p. 81-5, 2012.

NUNES, D. C.; FIGUEIRA, M. M.; LOPES, D. S.; DE SOUZA, D. L.; IZIDORO, L. F.; FERRO, E. A.; SOUZA, M. A.; RODRIGUES, R. S.; RODRIGUES, V. M.; YONEYAMA, K. A. BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A2 from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Parasitology.** v. 140, nº 7, p. 844-54, 2013.

NUNES, E. DOS S.; DE SOUZA, M. A.; VAZ, A. F.; SANTANA, G. M.; GOMES, F. S.; COELHO, L. C.; PAIVA, P. M.; DA SILVA, R. M.; SILVA-LUCCA, R. A.; OLIVA, M. L.; GUARNIERI, M. C.; CORREIA, M. T. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.** v. 159, nº 1, p. 57-63, 2011.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.** v. 109, nº 2, p. 347-52, 1995.

PONCINI, C. V.; ILARREGUI, J. M.; BATALLA, E. I.; ENGELS, S.; CERLIANI, J. P.; CUCHER, M. A.; VAN KOOYK, Y.; GONZÁLEZ-CAPPA, S. M.; RABINOVICH, G. A. *Trypanosoma cruzi* Infection Imparts a Regulatory Program in Dendritic Cells

and T Cells via Galectin-1-Dependent Mechanisms. **J Immunol.** v. 195, nº 7, p. 3311-24, 2015.

RINI, J.; DRICKAMER, K. Carbohydrates and glycoconjugates. **Curr Opin Struct Biol.** v. 7, nº 5, p. 615-6, 1997.

RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F.; TEIXEIRA, S. S.; SILVEIRA, L. B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; GIGLIO, J. R.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A(2) from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon.** v. 50, p. 153-65, 2007.

RODRIGUES, R. S.; DA SILVA, J. F.; BOLDRINI FRANCA, J.; FONSECA, F. P.; OTAVIANO, A. R.; HENRIQUE SILVA, F.; HAMAGUCHI, A.; MAGRO, A. J.; BRAZ, A. S.; DOS SANTOS, J. I.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FONTES, M. R.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie.** v. 91, p. 490-501, 2009.

RODRIGUES, V. M.; LOPES, D. S.; CASTANHEIRA, L. E.; GIMENES, S. N.; NAVES DE SOUZA, D. L.; ACHE, D. C.; BORGES, I. P.; YONEYAMA, KA. Rodrigues RS. *Bothrops pauloensis* snake venom toxins: the search for new therapeutic models. **Curr Top Med Chem.** v. 15, nº 7, p. 670-84, 2015.

RODRIGUES, V. M.; MARCUSSI, S.; CAMBRAIA, R. S.; DE ARAUJO, A. L.; MALTA-NETO, N. R.; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E. A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon.** v. 44, p. 305-14, 2004.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; MANCIN, A. C.; FONTES, M. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization

and biological activity. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.** v. 121, p. 215-22, 1998.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIŽAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon.** v. 57, n° 5, p. 627-45, 2011.

SARRAY, S.; LUIS, J.; EL AYEB, M.; MARRAKCHI, N. Snake venoms C-type lectins and their receptors on platelets and cancerous cells. **Arch Inst Pasteur Tunis.** v. 85, n° 1-4, p. 69-80, 2008.

SARTIM, M.A.; RIUL, T. B.; DEL CISTIA-ANDRADE, C.; STOWELL, S. R.; ARTHUR, C. M.; SORGI, C. A.; FACCIOLI, L. H.; CUMMINGS, R. D.; DIAS-BARUFFI, M.; SAMPAIO, S. V. Galatrox is a C-type lectin in *Bothrops atrox* snake venom that selectively binds LacNAc-terminated glycans and can induce acute inflammation. **Glycobiology.** v. 24, n° 11, p. 1010-21, 2014.

SARTIM, M. A.; SAMPAIO, S. V. Snake venom galactoside-binding lectins: a structural and functional overview. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.** v. 24, p. 21-35, 2015.

SENGUPTA, S.; SINGH, S.; SENGUPTA, L. K.; BISEN, P. S. Phytolectins: natural molecules with immense biotechnological potential. **Indian J Exp Biol.** v. 35. n° 2, p. 103-10, 1997.

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

SHETTY, K. N.; LATHA, V. L.; RAO, R. N.; NADIMPALLI, S. K.; SUGUNA, K. Affinity of a galactose-specific legume lectin from *Dolichos lablab* to adenine revealed by X-ray crystallography. **IUBMB Life.** v. 65, n° 7, p. 633-44, 2013.

SILVA, F. P. JR, ALEXANDRE, G. M.; RAMOS, C. H.; DE-SIMONE, S. G. On the quaternary structure of a C-type lectin from *Bothrops jararacussu* venom--BJ-32 (BjcuL). **Toxicon**. v. 52, n° 8, p. 944-53, 2008.

SINGH, R.S.; BHARI, R.; KAUR, H. P. Current trends of lectins from microfungi. **Crit Rev Biotechnol**. v. 31, n° 3, p. 193-210, 2011.

THIJSSSEN, V. L.; HEUSSCHEN, R.; CAERS, J.; GRIFFIOEN, A. W. Galectin expression in cancer diagnosis and prognosis: A systematic review. **Biochim Biophys Acta**. v. 1855, n° 2, p. 235-47, 2015.

THULASITHA, W. S.; WHANG, I.; UMASUTHAN, N.; KANG, H. S.; MOTHISHRI, M. S.; LEE, S.; QIANG, W.; NOH, J. K.; LEE, J. A galectin related protein from *Oplegnathus fasciatus*: Genomic, molecular, transcriptional features and biological responses against microbial pathogens. **Dev Comp Immunol**. v. 56, p. 13-24, 2016.

TSUTSUI, S.; DOTSUTA, Y.; ONO, A.; SUZUKI, M.; TATENO, H.; HIRABAYASHI, J.; NAKAMURA, O. A C-type lectin isolated from the skin of Japanese bullhead shark (*Heterodontus japonicus*) binds a remarkably broad range of sugars and induces blood coagulation. **J Biochem**. v. 157, n° 5, p. 345-56, 2015.

VASTA, G. R.; FENG, C.; BIANCHET, M. A.; BACHVAROFF, T. R.; TASUMI, S. Structural, functional, and evolutionary aspects of galectins in aquatic mollusks: From a sweet tooth to the Trojan horse. **Fish Shellfish Immunol**. v. 46, n° 1, p. 94-106, 2015.

WALKER, J. R.; NAGAR, B.; YOUNG, N. M.; HIRAMA, T.; RINI, J. M. X-ray crystal structure of a galactose-specific C-type lectin possessing a novel decameric quaternary structure. **Biochemistry**. v. 43, n° 13, p. 3783-92, 2004.

WANG, K.; PENG, E. D.; HUANG, A. S.; XIA, D.; VERMONT, S. J.; LENTINI, G.; LEBRUN, M.; WASTLING, J. M.; BRADLEY, P. J. Identification of Novel O-Linked Glycosylated *Toxoplasma* Proteins by *Vicia villosa* Lectin Chromatography. **PLoS One**. v. 11, n° 3, p. e0150561, 2016.

WANG, L.; JIANG, R.; SUN, X. L. Recombinant thrombomodulin of different domains for pharmaceutical, biomedical, and cell transplantation applications. **Med Res Rev**. v. 34, n° 3, p. 479-502, 2014.

YAN, J.; YUAN, S. S.; JIANG, L. L.; YE, X. J.; NG, T. B.; WU, Z. J. Plant antifungal proteins and their applications in agriculture. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 99, n° 12, p. 4961-81, 2015.

YINGSAKMONGKON, S.; MIYAMOTO, D.; SRIWILAIJAROEN, N.; FUJITA, K.; MATSUMOTO, K.; JAMPANGERN, W.; HIRAMATSU, H.; GUO, C. T.; SAWADA, T.; TAKAHASHI, T.; HIDARI, K.; SUZUKI, T.; ITO, M.; ITO, Y.; SUZUKI, Y. In vitro inhibition of human influenza A virus infection by fruit-juice concentrate of Japanese plum (*Prunus mume* SIEB. et ZUCC). **Biol Pharm Bull**. v. 31. n° 3, p. 511-5, 2008.

ZELENSKY, A. N.; GREASY, J. E. The C-type lectin-like domain superfamily. **FEBS J**. v. 272, n° 24, p. 6179-217, 2005.

ZHANG, Y.; QIU, L.; SONG, L.; ZHANG, H.; ZHAO, J.; WANG, L.; YU, Y.; LI, C.; LI, F.; XING, K.; HUANG, B. Cloning and characterization of a novel C-type lectin gene from shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immunol**. v. 26, n° 1, p. 183-92, 2009.

Capítulo 2: Antiparasitismo induzido por uma lectina de tipo-C da peçonha de *Bothrops pauloensis* sobre *Toxoplasma gondii*

Resumo: Neste trabalho foram avaliados os efeitos de BpLec, uma lectina tipo-C que reconhece β -D-galactosídeos, isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*, sobre formas taquizoítas de *Toxoplasma gondii*. BpLec (0,195 μ g/mL-12,5 μ g/mL) não alterou a viabilidade da célula hospedeira HeLa, enquanto concentrações maiores que 25 μ g/mL diminuíram a viabilidade e alteraram a morfologia celular. Quando células HeLa foram tratadas previamente à infecção com *T. gondii*, BpLec não interferiu nas taxas de adesão e proliferação dos taquizoítos. BpLec (2,5 μ g/mL, 5 μ g/mL e 10 μ g/mL) também não alterou a viabilidade de formas taquizoítas, mas reduziu tanto a adesão quanto a replicação parasitárias, quando apenas os parasitos foram tratados pela toxina. Sobrenadantes foram coletados dos ensaios de proliferação para a mensuração de citocinas, mostrando que BpLec induziu uma diminuição na produção de MIF e um aumento na secreção de IL-6 por células HeLa. Ainda mais, a secreção de TGF- β 1 foi diminuída pós-infecção, apesar de esse efeito aparentemente ter sido independente do tratamento com BpLec. Para verificar uma possível interação de BpLec com a estrutura parasitária, camundongos C57BL/6 foram imunizados com BpLec e o sangue dos animais coletado para a obtenção de imunoglobulinas G, que foram eficientemente purificadas em cromatografia de afinidade em resina Proteína G Sepharose, sendo então denominadas anticorpo anti-BpLec. A validação do reconhecimento de BpLec pelo anticorpo aqui produzido foi confirmada por *immunoblot* e imunofluorescência, revelando que BpLec interage com a membrana dos taquizoítos. Os resultados sugerem que BpLec reduz a interação e o parasitismo de *T. gondii* com relação a sua célula hospedeira (HeLa) após o tratamento de taquizoítos com a toxina, indicando que BpLec pode representar uma interessante ferramenta na busca de antígenos parasitários envolvidos nesses processos, assim como pode contribuir para um melhor entendimento sobre os mecanismos envolvidos na interação parasito-hospedeiro.

Palavras-chave: Lectina tipo-C, peçonha de serpente, toxoplasmose.

Abstract:

Abstract: Here we evaluate the effects of BpLec, a C-type lectin isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom, on *Toxoplasma gondii* parasitism. BpLec (0.195 µg/mL to 12.5 µg/mL) did not interfere with HeLa (host cell) viability by MTT assay, whereas higher doses decreased viability and changed HeLa morphology. In addition, the host cell treatment before infection did not influence adhesion and proliferation indexes. BpLec did not alter *T. gondii* tachyzoite viability, as carried out by trypan blue exclusion, but decreased both adhesion and parasite replication, when tachyzoites were treated before infection. Galactose (0.4 M) inhibited the BpLec effect on adhesion assays, suggesting that BpLec probably recognize some glycoconjugate from *T. gondii* membrane. Additionally, we performed cytokine measurements from supernatants collected from HeLa cells infected with *T. gondii* tachyzoites previously treated with RPMI or BpLec. MIF and IL-6 productions by HeLa cells were increased by BpLec treatment. Also, TGF-β1 secretion was diminished post-infection, although this effect was not dependent on BpLec treatment. Taken together, our results show that BpLec is capable of reducing *T. gondii* parasitism after tachyzoite treatment and may represent an interesting tool in the search for parasite antigens involved in these processes.

Keywords: C-type lectin, snake venom, *Toxoplasma gondii*.

1. Introdução

Toxoplasmose é uma doença causada por *Toxoplasma gondii*, um parasito intracelular obrigatório que tem como hospedeiro definitivo, membros da família Felidae, e, como hospedeiros intermediários, outros animais, incluindo humanos (TENTER et al., 2000). Existem três formas infectantes do parasito, os taquizoítos, os bradizoítos e os esporozoítos, que podem ser ingeridos pelo hospedeiro definitivo, acarretando na progressão da doença, sobretudo em gatos (FRENKEL et al., 1970; DUBEY, 2009). Os oocistos contêm os esporozoítos em seu interior e representam o estágio de resistência existente no meio ambiente, visto que são liberados nas fezes dos felídeos, garantindo uma maior sobrevivência parasitária em todo o mundo (DUBEY, 2009). Os bradizoítos são adaptados para uma maior resistência nos hospedeiros, apresentando uma taxa de replicação mais lenta (SIBLEY et al., 1999; DE LIMA et al., 2015). Por sua vez, os taquizoítos replicam-se muito rapidamente por divisão binária, participando da fase aguda da doença (SIBLEY et al., 1999; DE LIMA et al., 2015).

Em humanos, a doença geralmente é assintomática, sendo que os casos de maiores riscos ocorrem entre os indivíduos imunocomprometidos e gestantes (TENTER et al., 2000). A toxoplasmose congênita apresenta um alto índice de morbidez, sobretudo no Brasil, com manifestações clínicas que englobam distúrbios neurológicos, lesões oculares e perda de audição (GILBERT et al., 2008; DUBEY et al., 2012). A toxoplasmose apresenta uma alta taxa de infecção, de modo que 1/3 da população mundial é considerada soropositiva e muitos desses casos estão associados à morte dos indivíduos (MONTROYA E LIESENFELD, 2004). No Brasil, a soroprevalência de 84% já foi relatada para crianças, ao passo que grávidas apresentam taxas entre 36% e 92%, dependendo da região do país analisada e indicando que o Brasil é um dos países com as maiores taxas de soroconversão para a toxoplasmose (DUBEY et al., 2012). Ainda mais, a patogênese é mais severa em crianças brasileiras, quando comparadas às europeias, provavelmente devido à cepa do parasito presente no Brasil (GILBERT et al., 2008; DUBEY et al., 2012). Outros relatos apontam a prevalência de cepas intermediárias ou altamente virulentas em

humanos e animais residentes em Minas Gerais, no Sudeste brasileiro (CARNEIRO et al., 2013).

O desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da toxoplasmose é de crucial importância, visto que a terapia mais utilizada atualmente, uma combinação de sulfadiazina e pirimetamina, acarreta vários efeitos colaterais (PORTES et al., 2012). Dessa forma, novas alternativas para o tratamento da toxoplasmose tornam-se de grande interesse. Muitos estudos demonstram aplicações biotecnológicas de toxinas isoladas de peçonhas ofídicas, sobretudo para o tratamento de hipertensão, trombose, câncer, parasitoses, entre outras (RABELO et al., 2012; BHATTACHARYA et al., 2013; CECILIO et al., 2013; Rough et al., 2014). Ainda mais, toxinas ofídicas constituem modelos estruturais para o desenho de drogas comerciais (GOMES et al., 2010; KINI, 2011).

Lectinas são proteínas abundantes em vários organismos, desde microorganismos a plantas, e também estão presentes em peçonhas de serpentes (LIS E SHARON, 1986; UTARABHAND et al., 2007; CLEMETSON et al., 2009). Em consequência de sua propriedade ligante de carboidratos, essas lectinas de diferentes origens são utilizadas como marcadores de glicoconjugados em vários tipos celulares (FAUQUENOY et al., 2008; HIRABAYASHI et al., 2001; LUO et al., 2011).

Em *T. gondii*, muitas glicoproteínas existentes em micronemas, roptrias e grânulos densos influenciam a virulência do parasito (MELO et al., 2011). Apesar de alguns trabalhos relatarem que a glicosilação seria um evento raro em *T. gondii*, glicoproteínas são relativamente abundantes em taquizoítos da cepa RH e participam da progressão da toxoplasmose (LUO et al., 2011). Muitas dessas glicoproteínas estão envolvidas na adesão do parasito a sua célula hospedeira, assim como no consequente processo de invasão, sendo identificadas com o auxílio de metodologias que empregam lectinas, como Concanavalina A (ConA), WGA e Jacalina (FAUQUENOY et al., 2008; LUO et al., 2011). ConA também possibilitou a identificação de proteínas do glideosoma, sugerindo que o tratamento com essa lectina interfere nas funções parasitárias (FAUQUENOY et al., 2008; LUO et al., 2011). Interessantemente, uma lectina isolada de *Dolichos biflorus* (DBA), específica para N-acetil-D-galactosamina, tem sido utilizada na identificação da diferenciação de formas bradizoítas de *T. gondii*, além de

possibilitar a quantificação de cistos presentes até mesmo em baixas concentrações (MATRAJT et al., 2002; ALDEBERT et al., 2011; PORTES et al., 2012).

Análises proteômicas de *T. gondii* com o auxílio de lectinas são empregadas não apenas para um melhor entendimento da infecção parasitária, mas também para se detectar alvos na membrana do parasito utilizados na confecção de fármacos (CHE et al., 2011). Muitos estudos são realizados empregando a marcação com lectinas de glicoproteínas existentes em taquizoítos e bradizoítos de *T. gondii*, mas experimentos demonstrando os efeitos biológicos dessas lectinas nas funções parasitárias ainda não foram realizados (FAUQUENOY et al., 2008; LUO et al., 2011). Neste sentido, o atual trabalho investigou os efeitos antiparasitários de BpLec, uma lectina tipo-C isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*, sobre adesão e proliferação de formas taquizoítas de *T. gondii*.

2. Material e métodos

2.1. Peçonha bruta e animais

A peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* foi obtida a partir de espécimes mantidas no Serpentário Proteína Bioativas LTDA (Batatais, SP). Este serpentário possui comprovante de registro no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (cadastro nº 471301).

Camundongos isogênicos C57BL/6 e camundongos *Swiss* fêmeas de aproximadamente 6-8 semanas (20-30 g de massa corporal) foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CBEA/UFU) e mantidos em condições padrões de temperatura (25°C), umidade relativa do ar 60-65%, ciclo claro-escuro de 12 horas, ração e água *ad libitum*. Os procedimentos realizados com animais apresentam aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA, número dos protocolos 018/12 e 051/13, respectivamente) da Universidade Federal de Uberlândia e estão em acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

2.2. Obtenção de BpLec e confirmação de sua identidade

2.2.1. Isolamento de BpLec

BpLec foi inicialmente purificada da peçonha de *Bothrops pauloensis*, como descrito por Castanheira et al. (2013). Resumidamente, a peçonha cristalizada de *B. pauloensis* foi dissolvida em tampão CTBS (NaCl 150 mM, Tris 20 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,4) e centrifugada duas vezes a 2450 g por 10 minutos cada, a 4°C, para a retirada do material insolúvel. O sobrenadante foi aplicado a uma coluna de afinidade de agarose imobilizada com D-galactose (0,5 x 4 cm, Pierce, EUA) e incubada por aproximadamente uma hora. A coluna, que havia sido previamente equilibrada em CTBS, foi eluída inicialmente no mesmo tampão e, após a eluição das proteínas que não interagem com a resina, adicionou-se ao tampão uma solução de D-galactose 400 mM para a remoção da proteína BpLec aderida a coluna. A eluição da proteína foi acompanhada pela leitura da absorbância a 280 nm a um fluxo de 0,1 mL/min. Em seguida, para remover a galactose presente nas frações contendo a lectina BpLec, foi realizada uma cromatografia de exclusão molecular em gel Sephadex G-25 (1,5 cm x 2,5 cm) no cromatógrafo Äkta Prime Plus (GE HealthCare, Suécia). A coluna foi equilibrada e eluída com bicarbonato de amônio 100 mM pH 7,8, a um fluxo de 0,5 mL/min, coletando-se 500 µL/tubo a 280 nm.

A fração contendo a proteína BpLec foi recromatografada em sistema de cromatografia de fase reversa em coluna C18 (2,0 x 2,5 cm, GE HealthCare, Suécia). A coluna foi previamente equilibrada com solvente A (ácido trifluoroacético 0,1% e 5% de acetonitrila, v/v). A eluição da proteína foi realizada utilizando um gradiente linear de solvente B (0,1% de ácido trifluoroacético e 80% de acetonitrila) de 0% a 100%, a um fluxo de 0,5 mL/min a 25°C a 280 nm. Em todas as etapas, a quantificação proteica da amostra foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976).

2.2.2. Eletroforese em SDS-PAGE

Eletroforeses em SDS-PAGE 12,5% (m/v) foram realizadas após o término dos passos de purificação de BpLec para certificar a homogeneidade da proteína isolada, conforme descrito por Laemmli (1970), com modificações. Amostras contendo 10 µg de proteína foram solubilizadas em 10 µL de tampão de amostra [Tris HCl 50 mM pH 6,8, dodecil sulfato de sódio 2% (m/v; SDS), azul de bromofenol 1% (m/v) e glicerol 10% (v/v)] e aquecidas a 100°C durante 10 minutos, na presença de 10 µL de β-mercaptoetanol 5% (v/v), e então corridas em tampão Tris-glicina 250 mM pH 8,3 durante aproximadamente 45 minutos a 10 mA e 300 V. Os géis foram posteriormente corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,2% (v/v). Os marcadores de massa molecular utilizados foram: albumina de soro de bovino (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), tripsinogênio (24 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa) e α-lactalbumina (14,2 kDa) (Amersham Bioscience).

2.2.3. Atividade Hemaglutinante

A atividade biológica da proteína isolada foi confirmada por ensaio de hemaglutinação, como descrito por Castanheira et al. (2013). Resumidamente, sangue canino, gentilmente cedido pelo Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia, foi coletado por punção venosa utilizando-se tubos de coleta a vácuo, estéreis e sem anticoagulante. Em seguida, as amostras foram centrifugadas três vezes a 950 g durante 10 minutos a 25°C, na presença de tampão CTBS, com o intuito de separar os eritrócitos das plaquetas sanguíneas. Posteriormente, 25 µL da solução de eritrócitos a 2% (v/v) foram adicionados em microplacas de 96 poços de fundo redondo e imediatamente incubados com 25 µL de BpLec (0,5 µg) a 4°C durante duas horas. A hemaglutinação foi determinada pela análise visual dos poços, quando um botão referente à sedimentação celular não foi evidenciado, indicando aglutinação dos eritrócitos.

2.3. Cultura celular

A linhagem de células HeLa foi obtida da *American Type Culture Collection* (Manassas, VA, EUA) e mantida em garrafas de 75 cm² contendo meio RPMI-1640 (GIBCO, Paisley, Inglaterra), suplementado com HEPES 25 mM, carbonato de sódio 23 mM, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) e soro fetal bovino inativado a 10% em PBS

(Cultilab, Campinas, Brasil). As células foram incubadas a 37°C e CO₂ 5% em uma incubadora umidificada e repicadas a cada dois dias, após o descarte do meio e posterior descolamento das células por incubação com um mL de tripsina por cinco minutos, que foram centrifugadas a 400 g por 5 minutos e retornadas às garrafas em 15 mL de novo meio RPMI (BARBOSA et al., 2008).

Taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* foram obtidos de exudatos peritoneais de camundongos *Swiss*, previamente infectados de acordo com Mineo e Kasper (1994) e mantidos por passagens seriadas em células HeLa cultivadas no mesmo meio com soro fetal bovino a 2%, para a obtenção de parasitos *in vitro* (BARBOSA et al., 2008). Taquizoítos do clone 2F1, derivado da cepa RH que expressa a enzima citoplasmática β-galactosidase, foram gentilmente cedidos pelo Dr. Vern Carruthers (Faculdade de Medicina, Universidade de Michigan, USA). Os parasitos foram infectados em HeLa, onde replicavam e, posteriormente, evadiam para o meio. O meio contendo os taquizoítos foi centrifugado a 400 g por 5 minutos e os parasitos retirados do *pellet* para os demais experimentos.

2.4. Viabilidade de HeLa

Os efeitos citotóxicos de BpLec sobre HeLa foram testados baseados na oxidação mitocondrial do reagente brometo de 3-[4,5-dimetil tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio [do inglês, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma) (MTT)], segundo Mosmann (1983), com pequenas modificações. Células HeLa (3 x 10⁴ células/mL) foram crescidas em uma placa de 96 poços e incubadas no outro dia com BpLec (0,195 µg/mL a 100 µg/mL) por diluição dupla seriada. Após 24 horas de incubação com a toxina na incubadora umidificada (37°C e CO₂ 5%), os sobrenadantes foram descartados, substituídos por novo meio e 10 µL do reagente MTT (0,5 mg/mL) foram adicionados a cada poço, sendo a placa então mantida na incubadora umidificada por mais três horas. Em seguida, os cristais de formazan foram solubilizados por SDS 10% (m/v) em dimetilformamida 50% (v/v) e a absorbância mensurada a 570 nm após 30 minutos. O ensaio foi realizado em triplicata. Viabilidade celular foi expressa em porcentagem, considerando-se como 100% o controle de crescimento das células cultivadas com meio RPMI.

2.5. Viabilidade de taquizoítos da cepa RH

Taquizoítos de *T. gondii* (4×10^6 células/mL) foram tratados com BpLec (2,5 µg/mL, 5,0 µg/mL e 10 µg/mL) durante 30 minutos e corados com azul de tripan. As células viáveis, apresentando um citoplasma translúcido por excluir o corante azul de tripan, foram contadas em um microscópio óptico (Strober, 2001). Taquizoítos mantidos apenas em meio RPMI foram considerados como controle e expressos como 100% de viabilidade celular. O ensaio foi realizado em triplicata.

2.6. Adesão

Neste experimento, duas abordagens de tratamentos diferentes foram realizadas separadamente: na primeira, BpLec (3,125 µg/mL, 6,25 µg/mL e 10,0 µg/mL) foi incubada com HeLa (2×10^4 células/mL) durante uma ou 24 horas e os parasitos (1×10^5 células/mL) não tratados com BpLec foram adicionados posteriormente. Na outra abordagem, os taquizoítos foram previamente tratados com BpLec (2,5 µg/mL, 5,0 µg/mL e 10 µg/mL) durante 30 minutos e, posteriormente, utilizados para infectar células HeLa não tratadas. Cada ensaio foi realizado utilizando-se apenas um desses tratamentos exclusivamente. Para testar a especificidade de BpLec, todas as concentrações de BpLec usadas no tratamento do parasito foram inibidas por D-galactose 400 mM durante 30 minutos. Como controle, taquizoítos ou células HeLa também foram mantidas somente com meio RPMI durante o mesmo tempo utilizado no tratamento com BpLec.

Os experimentos de adesão foram realizados segundo metodologia descrita por Oliveira et al. (2006). Em suma, células HeLa (2×10^4 células/mL) foram crescidas em uma placa de 24 poços contendo lâminas circulares de 13 mm em cada poço. No dia seguinte, após a adesão das células às lamínulas, as células HeLa foram fixadas por paraformaldeído 8% (v/v) em PBS 4% (v/v) durante 30 minutos e os poços foram lavados três vezes com PBS, de forma que o paraformaldeído fixa as células, preservando as estruturas celulares. Taquizoítos (1×10^5 células/mL) foram adicionados a cada poço e, após três horas de interação, os parasitos foram fixados *overnight*. Uma nova lavagem com PBS foi realizada após o descarte da solução fixadora, para a remoção dos

parasitos não aderidos. As lamínulas foram retiradas das placas e coradas com azul de toluidina. Em cada lamínula, 200 células foram contadas em um microscópio óptico e os seguintes parâmetros foram avaliados: número de células HeLa com parasitos aderidos e o número total de parasitos aderidos a essas células. Três experimentos independentes foram realizados em triplicada, para cada abordagem de tratamento com BpLec.

2.7. Proliferação

Para os ensaios de inibição de proliferação do parasito na célula hospedeira, realizou-se o tratamento de células HeLa ou de taquizoítos separadamente, como descrito no ensaio de adesão (item 2.6). A proliferação parasitária foi mensurada baseada na reação da enzima β -galactosidase, presente nessa cepa modificada do parasito, de acordo com Teo et al. (2007), com algumas modificações. Células HeLa (2×10^4 células/mL) foram incubadas com BpLec (3,125 μ g/mL, 6,25 μ g/mL e 10,0 μ g/mL) ou meio RPMI em uma placa de 96 poços e mantidas por 24 horas em uma incubadora umidificada (37°C e CO₂ 5%). Para a abordagem de tratamento apenas do parasito com BpLec (2,5 μ g/mL, 5,0 μ g/mL e 10 μ g/mL), células HeLa não tratadas foram utilizadas e incubadas com o parasito tratado, seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente.

Em seguida, o sobrenadante das células foi descartado e parasitos ($1,5 \times 10^5$ células/mL) tratados ou não com BpLec foram adicionados aos poços e incubados por 24 horas na estufa de CO₂. Os sobrenadantes foram coletados para a mensuração de citocinas e as células foram incubadas com 50 μ L de tampão de lise (HEPES 100 mM, MgSO₄ 1mM, Triton X-100 0,1% (v/v), ditiotretitol 5 mM) por 15 minutos. Os lisados foram misturados com 160 μ L de tampão de ensaio (tampão fosfato 100 mM pH 7,3, β -mercaptoetanol 102 mM, MgCl₂ 9 mM) e, subsequentemente, com 40 μ L de CPRG 6,25 mM (clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosídeo; Roche, Indianapolis, IN, EUA). A leitura da absorbância foi realizada a 570 nm e os dados foram mostrados como número total de taquizoítos determinados pelo software Microplate Manager (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), utilizando-se uma curva padrão contendo concentrações conhecidas de taquizoítos.

2.8. Quantificação de citocinas

Os sobrenadantes provenientes do ensaio de proliferação (item 2.7) foram coletados para a mensuração de citocinas. Resumidamente, células HeLa (2×10^4 células/mL) foram cultivadas em uma placa de 96 poços e tratadas com BpLec (10,0 µg/mL, 5,0 µg/mL e 10 µg/mL) durante 24 horas para posterior coleta dos sobrenadantes. Taquizoítos ($1,5 \times 10^5$ células/mL) também foram tratados com BpLec nas mesmas concentrações e incubados durante 24 horas com células HeLa tratadas ou não com BpLec, coletando-se o sobrenadante também. Células HeLa cultivadas com meio RPMI durante o mesmo tempo utilizado no tratamento com BpLec também foram consideradas como controle.

As citocinas foram mensuradas por ELISA de acordo com instruções do fabricante (BD Biosciences, San Jose, California, USA), sendo os limites de detecção: 4,7 pg/ml para IL-6 e IFN- γ ; 7,8 pg/mL para IL-12 p70 e IL-10; 62,5 pg/mL para MIF (fator de inibição da migração de macrófagos); 125 pg/mL para TGF- β 1. Brevemente, placas de alta afinidade de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos contra cada citocina e incubadas overnight a 4°C ou a temperatura ambiente, dependendo do anticorpo utilizado. No dia seguinte, as placas foram lavadas com PBS-T 0,005% (500 µL de Tween 20 em 1000 mL de PBS) e bloqueadas com 100 µL de reagente de ensaio (PBS contendo soro albumina bovina a 10%) por uma hora a temperatura ambiente. Posteriormente, 50 µL de concentrações conhecidas de cada citocina ou 50 µL de sobrenadantes foram adicionados aos poços e incubados por duas horas a temperatura ambiente. Após a incubação, as placas foram novamente lavadas com PBS-T 0,005% (v/v) e os anticorpos de detecção conjugados com biotina foram adicionados aos poços (1:250 ou 1:1500, dependendo da citocina analisada), sendo a mistura incubada novamente por uma hora a temperatura ambiente. Streptavidina conjugada com peroxidase (1:250) foi, então, acrescentada a cada poço e as placas mantidas no escuro por 20 minutos a temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas com PBS-T 0,005% e reveladas com tetrametilbenzidina contendo peróxido de hidrogênio 0,003% (TMB). A reação foi pausada por 25 µL de H₂SO₄ 2N e as absorbâncias mensuradas a 450 nm após 30 minutos. As citocinas foram quantificadas pelo software Microplate Manager

(Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), de acordo com a curva padrão contendo concentrações conhecidas de cada citocina.

2.9. Ensaios imunológicos

2.9.1. Imunizações dos animais e coleta de sangue

Cinco camundongos isogênicos C57BL/6 fêmeas de aproximadamente 6-8 semanas (20-30 g de massa corporal) foram imunizados por injeção de 50 µg/animal de BpLec solubilizada em 10 µL de PBS, aplicada via intramuscular na pata traseira do animal. Foram realizadas três imunizações com intervalos de duas semanas, sendo a primeira inoculação feita com adjuvante de Freund completo e as demais com adjuvante de Freund incompleto (razão 1:1 v/v, solução imunogênica/adjuvante). Após o fim dos intervalos, o sangue dos animais (500 µL) foi coletado por punção do plexo venoso retro orbital utilizando tubos capilares de vidro heparinizados. Quinze dias após a última imunização, foi realizada a sangria dos animais pelo mesmo procedimento, que foram sacrificados imediatamente por deslocamento cervical. Adicionalmente, também foi coletado sangue de camundongos isogênicos C57BL/6 fêmeas não imunizados (n=5), porém previamente infectados com taquizoítos de *T. gondii* (item 2.3) e sangue de camundongos isogênicos C57BL/6 fêmeas sem nenhum tipo de tratamento (não imunizados e ao mesmo tempo não infectados, n=5), ambos utilizados mais adiante como controles nos ensaios de imunofluorescência.

2.9.2. Preparação do soro e purificação das IgGs

Para obtenção do soro total, as amostras de sangue coletadas (item 2.9.1.) foram mantidas *overnight* na geladeira para formação dos coágulos. Os tubos foram centrifugados a 524 g por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram cuidadosamente coletados, evitando-se a aspensão dos coágulos. Em seguida, as amostras de soro correspondentes à imunização com BpLec foram agrupadas para o isolamento das imunoglobulinas G (IgGs) por cromatografia de afinidade em coluna proteína G Sepharose HiTrap de 5 mL (1,6 x 2,5 cm) no sistema Äkta Prime Plus (GE HealthCare, Suécia), de acordo com as instruções do manual do

fabricante. A coluna foi previamente equilibrada com Tris HCl 100 mM contendo NaCl 150 mM pH 7,5, sendo a eluição realizada na mesma solução, num fluxo de 0,5 mL/min a temperatura ambiente, coletando-se 1 mL por tubo. Após a eluição das proteínas não específicas e ao atingir-se a linha de base, pelo acompanhamento das frações proteicas a 280 nm, foi introduzido um gradiente com 100% de glicina 100 mM pH 2,7, para a obtenção das frações contendo IgG. Nos tubos referentes às amostras IgG, foram adicionados 200 µL de Tris HCl 1M pH 9, para a proteção do estado nativo destas imunoglobulinas. Em seguida, tais amostras foram submetidas à diálise por SnakeSkin™ Dialysis Tubing (Thermo Scientific) em membrana de 22 mm de diâmetro em 2 mL de água MILLI-Q a 4°C, realizando-se três trocas do volume de água a cada duas horas (WALKER, 1996). A quantidade de proteínas presentes nas amostras foi estimada pelo método de Bradford (1976).

2.9.3. Confirmação do reconhecimento de BpLec pela IgG purificada

Para certificar o reconhecimento de BpLec pela IgG purificada, foi realizada a metodologia de *immunoblot*. Resumidamente, BpLec (30 µg), em condições não redutoras, foi submetida a eletroforese SDS-PAGE a 12,5% (item 2.2.2) e, em seguida, transferida para membrana de nitrocelulose (0,45 µm, Sigma), por meio de transferência semiúmida em sistema Multiphor Novablot II (Pharmacia-LKB, EUA) durante duas horas a 51 mA, conforme descrito por TOWBIN et al. (1979). A eficiência da eletrotransferência foi avaliada pela coloração da membrana de nitrocelulose com *Ponceau-S Red* a 0,5% (m/v) preparado em ácido trifluoracético 0,0025% (v/v).

A membrana foi então descorada com água e recortada em tiras de aproximadamente três mm para análise da marcação por IgG. A tira foi subsequentemente incubada com leite desnatado 5% (m/v) em PBS contendo Tween a 0,005% (v/v) (PBS-T) durante uma hora a temperatura ambiente, para bloquear sítios não específicos. Posteriormente, a tira foi incubada *overnight* a 4°C com a solução IgG purificada diluída a 1:1000 (v/v) em PBS-T contendo leite desnatado a 1% (m/v). Após quatro lavagens, de cinco minutos cada, com 700 µL de PBS-T, a tira foi incubada com 500 µL de leite desnatado a 10% (m/v) dissolvido em PBS-T, contendo anticorpo secundário de camundongo anti-IgG

conjugado com peroxidase (1:1000, Sigma), a temperatura ambiente por duas horas sob leve agitação. Por fim, a tira foi lavada novamente cinco vezes em 700 µL de PBS-T e revelada com DAB [3,3 diaminobenzidino, Sigma; 0,03% (m/v) em Tris-HCl 20 mM, pH 7,6, contendo H₂O₂ 0,03% (v/v)]. A reação foi pausada pela adição de água quando bandas de coloração marrom foram visualizadas.

A marcação de BpLec foi finalizada pela análise da banda corada na membrana pelo programa de análise de imagens Image Master 2D Platinum e comparação de sua massa molecular (kDa) com padrões de massas moleculares (The BenchMark™ Protein Ladder; ThermoScientific), sendo eles: fosforilase B (160 kDa), albumina de soro de bovino (80 kDa), glutamato desidrogenase (60 kDa), álcool desidrogenase (50 kDa), anidrase carbônica (40 kDa), mioglobina *blue* (30 kDa), mioglobina *red* (20 kDa) e lisozima (15 kDa).

2.9.4. Imunofluorescência

O ensaio foi realizado de acordo com Figueiredo et al. (2001), com algumas modificações. Resumidamente, o *pellet* contendo os taquizoítos obtidos após o repique celular (item 2.3) foi incubado com 1 mL de formol 1% (v/v) durante 30 minutos a 37°C e, em seguida, 10 µL desta solução foram adicionados aos poços das lâminas. Após a secagem dos poços a temperatura ambiente, as lâminas foram então armazenadas em geladeira até o momento de realização da marcação, sendo que cada poço foi previamente analisado em microscópio óptico para se confirmar a fixação do parasito. Para a análise das regiões do parasito reconhecidas por BpLec, foram utilizadas duas abordagens: uma com o parasito intacto (sem permeabilização de membrana), para avaliar a possível marcação da membrana parasitária; e na outra abordagem, os parasitos foram permeabilizados, para identificação de uma possível marcação de estruturas internas do parasito por BpLec. Na abordagem de permeabilização, a lâmina foi mergulhada em uma solução de PBS contendo Triton X-100 0,1% (v/v) durante 30 minutos, responsável pelo rompimento da membrana parasitária. Em seguida, a lâmina foi lavada três vezes em PBS por cinco minutos cada, sendo que os passos seguintes foram realizados para ambas as abordagens acima descritas.

Assim, os poços das lâminas foram incubados com 10 µL de BpLec (5 µg, 10 µg e 20 µg) ou apenas PBS durante 30 minutos em estufa a 37°C. Em

seguida, as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS e por fim em água, durante cinco minutos cada e, após os poços secarem, o anticorpo anti-BpLec (20 µg em 10 µL de PBS) foi adicionado aos poços e incubado por 30 minutos novamente na estufa. Em um poço tratado apenas com PBS, foi realizado um controle contendo apenas anticorpo anti-BpLec (1:1), para averiguar se o anticorpo também poderia interagir com as estruturas parasitárias. Ao mesmo tempo, um controle contendo apenas soro de camundongos infectados com *T. gondii* também foi testado em outro poço tratado com PBS, para análise da eficiência da reação. Também foi feito um controle com soro de animais não infectados, acrescentado a um poço tratado também com PBS. Ao fim da incubação, as lâminas foram novamente lavadas e 10 µL de uma solução contendo azul de evans e anticorpo *anti-mouse* conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC; 1:25) foi adicionada a cada poço, reagindo por 30 minutos na estufa. As lâminas foram então lavadas três vezes e montadas utilizando-se glicerina tamponada (pH 8,0-8,6), para análise das imagens em microscópio de fluorescência (EVOS FL Cell Imaging System, ThermoScientific).

2.10. Análise estatística

Todos os dados foram avaliados como média±desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. Diferenças entre tratamentos e controles foram analisados por ANOVA com comparações múltiplas por Bonferroni, utilizando-se GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). Resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

3. Resultados e discussão

A ação antiparasitária de peçonhas ofídicas e de suas toxinas isoladas tem sido investigada sobre diferentes patógenos, como *Plasmodium falciparum* (KAYANO et al., 2015; TERRA et al., 2015; EL CHAMY MALUF et al., 2016), espécies de *Leishmania* (PASSERO et al., 2007; NUNES et al., 2013; COSTA et al., 2015; TERRA et al., 2015), *Toxoplasma gondii* (SAFFER et al., 1989; BASTOS et al., 2008), *Trypanosoma cruzi* (DEOLINDO et al., 2010; ADADE et al.,

2011; COSTA et al., 2015), entre outros. Sobre lectinas tipo-C, alguns trabalhos demonstraram seus efeitos sobre alguns patógenos de importância médica (PASSERO et al., 2005; BARBOSA et al., 2010; NUNES et al., 2011; CASTANHEIRA et al., 2013; Sartim e Sampaio, 2015). Passero e colaboradores (2007) demonstraram que a Convulxina, isolada de peçonhas de subespécies da cascavel *Crotalus durissus*, possui propriedades leishmanicidas, diminuindo a taxa de crescimento de promastigotas em concentrações não tóxicas. Nunes e colaboradores (2011) também relataram os efeitos bactericidas de BIL (*Bothrops leucurus*), em baixas concentrações, sobre as bactérias Gram-positivas *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis*, ao passo que BmLec, isolada da peçonha de *Bothrops moojeni*, possui ação antibacteriana sobre bactérias Gram-negativas, sendo esse efeito causado por aglutinação celular, indução da formação de vesículas na membrana celular e ruptura da membrana (BARBOSA et al., 2010). Recentemente, Klein e colaboradores (2015) mostraram que BjcUL (*Bothrops jararacussu*) desfaz a formação de biofilme por diversos patógenos bacterianos, que estão associados a infecções inflamatórias persistentes, como a mastite bovina.

Os efeitos de uma toxina isolada da peçonha ofídica de *Bothrops pauloensis* sobre *Toxoplasma gondii* foram primeiramente demonstrados por Bastos e colaboradores (2008). Os autores mostraram que a neuwiedase, uma metaloprotease, reduziu a invasão e replicação de taquizoítos tratados antes e depois da invasão. Estes estudos nos estimularam a avaliar os efeitos de uma lectina tipo-C (BpLec), também isolada da peçonha de *B. pauloensis* sobre a adesão e proliferação de *T. gondii*.

BpLec foi eficazmente isolada após submissão da peçonha de *B. pauloensis* a uma cromatografia de afinidade com D-galactose (Fig. 1A). Após a remoção do carboidrato presente na amostra de BpLec por uma gel filtração em Sephadex G-25, o grau de homogeneidade da amostra foi confirmada por cromatografia em fase reversa, revelando a presença de um pico proteico bastante simétrico obtido após eluição em torno de 60% de solvente B (Fig. 2B). A homogeneidade da amostra também foi confirmada por eletroforese em gel de poliacrilamida, observando-se uma banda bastante homogênea em torno de 14 kDa, quando a amostra foi incubada com o agente redutor β -mercaptoetanol (Fig.

1C), corroborando com os valores demonstrados anteriormente para cada subunidade da proteína (CASTANHEIRA et al., 2013). Os dados aqui obtidos assemelham-se bastante ao trabalho original de Castanheira e colaboradores (2013), que descreveram previamente a obtenção e caracterização bioquímica de BpLec, seguindo-se os mesmos passos cromatográficos. A atividade biológica da proteína foi confirmada por hemaglutinação utilizando-se eritrócitos de cão (dados não mostrados). Assim, após a validação da homogeneidade da amostra e confirmação de suas características bioquímicas, o antiparasitismo induzido por BpLec sobre *Toxoplasma gondii* foi avaliado.

BpLec não foi citotóxica para as células HeLa em concentrações de 0,195 µg/mL a 12,5 µg/mL, conforme estimado pela viabilidade por MTT. Por outro lado, concentrações acima de 25 µg/mL reduziram a viabilidade de células HeLa e induziram alterações na confluência nesse tipo celular (Figura 2). CaL, uma lectina isolada da esponja marinha *Cinachyrella apion*, inibiu a proliferação de HeLa de forma concentração-dependente, porém baixas concentrações (até 0,5 µg/mL) foram suficientes para alterar a viabilidade da célula (RABELO et al., 2012). Considerando os dados obtidos no presente trabalho, as concentrações subtóxicas de 3,125 µg/mL, 6,25 µg/mL e 10,0 µg/mL de BpLec foram escolhidas para os próximos ensaios. O tratamento de células HeLa com BpLec nestas concentrações não alterou a adesão e a proliferação de formas taquizoítas de *T. gondii* (Figura 3).

BpLec (2,5 µg/mL, 5,0 µg/mL e 10,0 µg/mL) não interferiu na viabilidade de taquizoítos do parasito (Tabela 1) e não induziu aglutinação parasitária (dados não-mostrados), mas foi capaz de diminuir sua adesão à HeLa após um tratamento de 30 minutos dos taquizoítos previamente ao contato com a célula hospedeira, reduzindo o número de células com parasitos aderidos (Figura 4A) e o número total de parasitos aderidos a essas células (Figura 4B). D-galactose 400 mM inibiu a ação de BpLec sobre a adesão parasitária (Figura 4). Castanheira et al. (2013) mostraram que as mesmas concentrações de BpLec aglutinaram promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, outro parasito pertencente ao filo Apicomplexa. Este efeito pode ser explicado pela interação entre o domínio de reconhecimento ao carboidrato (CRD) presente em BpLec e alguns glicoconjugados presentes na membrana do parasito. Como demonstrado

pelos autores, esta aglutinação dos promastigotas é inibida por D-galactose ou β -galactosídeos (CASTANHEIRA et al., 2013), o que nos leva a hipotetizar que BpLec provavelmente reconhece glicoconjugados presentes na membrana de *T. gondii* contendo algum desses carboidratos em sua estrutura.

A glicosilação é um passo crucial em vários processos celulares, tais como ancoragem celular, migração e invasão (XIE et al., 2009). A invasão de parasitos do filo Apicomplexa na célula hospedeira é iniciada por interações com receptores da célula hospedeira que são influenciados por proteínas do micronema, atraindo o parasito para a superfície da célula hospedeira (SANTOS E SOLDATI-FAVRE, 2011). Este processo é mediado pela interação superfície-superfície, de modo que BpLec talvez esteja reconhecendo alguma glicoproteína na membrana do taquizoíto que bloqueie a adesão do parasito à HeLa. A superfície dos taquizoítos é composta por muitas proteínas conhecidas como antígenos de superfície (SAGs, do inglês, antígenos de superfície) (MA et al., 2009). SAG3, por exemplo, é uma glicoproteína presente na membrana de parasitos da cepa RH que participa diretamente na adesão e invasão de *T. gondii* às células hospedeiras *in vitro* (DZIERSZINSKI et al., 2000; DUBREMETZ et al., 2012). Por sua vez, SAG1 e SAG2 estão presentes nas superfícies de taquizoítos e bradizoítos, que são revestidas por glicosilfosfatidilinositol ancorados, os quais participam dos eventos de invasão e modulação da resposta imune pelo parasito (BÉLA et al., 2008). Uma vez que, em *T. gondii*, glicoproteínas atuam nos processos de infecção, importantes para a sobrevivência parasitária, a glicosilação nesse parasito pode representar um emergente alvo para o tratamento da doença (FAUQUENOY et al., 2008; LUK et al., 2008).

BpLec também foi capaz de diminuir a proliferação parasitária, avaliada pela mensuração de β -galactosidase (Figura 5). Luo e colaboradores (2011) demonstraram que algumas lectinas que apresentam diferentes especificidades reconhecem constituintes da membrana de taquizoítos da cepa RH, assim como glicoeptopos citoplasmáticos. Dentre estas proteínas, algumas relacionadas ao processo de invasão foram identificadas por Jacalina, uma lectina que interage com D-galactose, assim como BpLec. As proteínas reconhecidas pela Jacalina incluem Gra2 (ou p28), Gra7, ROP4, ROP16, TgRON5, TgSUB2 e Toxofilina, que são relacionadas à formação do vacúolo parasitóforo, adesão e invasão do

parasito à célula hospedeira (LUO et al., 2011). Em contrapartida, as proteínas reconhecidas por BpLec ainda precisam ser elucidadas posteriormente, assim como a relação entre os antígenos reconhecidos por BpLec e as alterações provocadas pela toxina no parasitismo de *T. gondii*.

T. gondii é um parasito intracelular conhecido por influenciar a resistência do hospedeiro afetando as funções de várias células do sistema imune (Bernardes et al., 2006). Nesse sentido, foi investigada a presença de citocinas no sobrenadante de células HeLa tratadas com BpLec (2,5 µg/mL, 5,0 µg/mL e 10 µg/mL) durante 24 horas. Níveis de IL-10, IL-12 e IFN-γ ficaram abaixo dos limites de detecção (dados não mostrados). A secreção de IL-6 por HeLa foi aumentada pós-infecção pelos tratamentos dos taquizoítos com RPMI e BpLec (Fig. 6A). BpLec (5,0 µg/mL e 10 µg/mL) induziu uma maior secreção de IL-6, quando comparado com o controle com RPMI. Esta citocina tem sido correlacionada com o controle do parasitismo em toxoplasmose, corroborando os efeitos biológicos de BpLec sobre taquizoítos vistos neste trabalho (SUSUKI et al., 1999; CASTRO et al., 2013).

Todavia, todas as concentrações de BpLec utilizadas no tratamento dos taquizoítos foram capazes de diminuir a produção de MIF, enquanto o controle com RPMI não interferiu na secreção desta citocina (Fig. 6B). Contrariamente aos nossos resultados, Carvalho e colaboradores (2010) relataram que os níveis de MIF eram maiores quando HeLa era infectada com *Neospora caninum*, um parasito pertencente ao filo Apicomplexa bastante relacionado a *T. gondii*. Os autores também propuseram que *N. caninum* e *T. gondii* possuem diferentes mecanismos de invasão e evasão, o que poderia resultar em perfis de secreção de citocinas distintos pós-infecção (CARVALHO et al., 2010). Entretanto, a discrepância desses resultados também pode ser decorrente de uma controvérsia sobre a função do MIF nas doenças protozoárias (ROSADO et al., 2011).

MIF possui um papel crítico no controle da infecção da toxoplasmose, reduzindo mortalidade e provavelmente está envolvido na resistência do hospedeiro, como demonstrado em pacientes que morreram por toxoplasmose encefalítica (FLORES et al., 2008; TERRAZAS et al., 2010). BpLec diminui a secreção de MIF pela célula hospedeira, provavelmente por interagir com proteínas da superfície do parasito relacionadas com indução da produção e/ou

secreção de MIF. É possível que a redução de MIF observada neste trabalho também esteja associada a uma estratégia do parasito para sobreviver em um meio com menores índices de adesão e proliferação induzidos por BpLec, apesar de que futuros ensaios demonstrando a relação entre os efeitos de BpLec no parasitismo e a redução na secreção de MIF são necessários.

Taquizoítos incubados somente com RPMI ou BpLec diminuíram os níveis de fator de transformação de crescimento- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) por HeLa (Fig. 6C), indicando que tal resultado seria provavelmente causado pelo contato do parasito com a célula hospedeira e não exclusivamente seria uma ação da toxina. TGF- $\beta 1$ pode ser considerado tanto pro- quanto anti-inflamatório, sendo um efeito espécie-específico e sem efeitos clínicos benéficos na toxoplasmose (NAMANGALA et al., 2009). Omer e Kurtzhals (2000) afirmaram que TGF- $\beta 1$ possui um papel pró-inflamatório quando encontrado em baixas concentrações, sugerindo que a diminuição de TGF- $\beta 1$ visto aqui seria uma possível estratégia da célula hospedeira em se defender contra o parasitismo de *T. gondii*. Neste sentido, uma vez que BpLec reduziu adesão e invasão dos taquizoítos, a redução nos níveis de TGF- $\beta 1$ é esperado.

Awandare e colaboradores (2006) demonstraram que a depleção dupla dos níveis de MIF e TGF- $\beta 1$ em crianças com malária resultou em um aumento na severidade da doença. Redução de MIF e TGF- $\beta 1$ também foram relatados aqui, porém se BpLec causa alguma modificação na patogênese da toxoplasmose ainda precisa ser investigado. Ainda mais, visto que poucas citocinas foram detectadas no presente estudo, não foi possível delinear um perfil de expressão de citocinas induzido por BpLec, dificultando uma possível correlação desse perfil com as funções parasitárias aqui avaliadas.

Visto que BpLec inibiu funções parasitárias de *T. gondii in vitro*, como adesão e proliferação, assim como estimulou uma alteração na secreção de citocinas pela célula hospedeira (HeLa), a detecção de regiões parasitárias reconhecidas por BpLec são de grande interesse. Neste contexto, camundongos fêmeas de C57BL/6 foram imunizados com BpLec para a obtenção de anticorpos contra a toxina, sendo posteriormente utilizados em ensaios que permitiram a marcação de BpLec. Após a coleta do sangue dos animais seguida pela obtenção do soro total, as imunoglobulinas G (IgGs) foram eficientemente purificadas por

cromatografia de afinidade em Proteína G HiTrap, sendo chamadas de anticorpo anti-BpLec (Fig 7A). A validação do reconhecimento de BpLec pelo anticorpo aqui purificado foi testada por *immunoblot*, em que foi identificada a marcação de uma única banda proteica com massa molecular de aproximadamente 28 kDa (Fig. 7B). Considerando-se que BpLec é uma proteína homodimérica com subunidades de aproximadamente 14 kDa cada (CASTANHEIRA et al., 2013), a proteína marcada pelo anticorpo anti-BpLec corresponde à BpLec, de modo que tal anticorpo pode ser utilizado como uma ferramenta de marcação da toxina nos mais diversos ensaios de caracterização biológica de BpLec.

Dessa forma, o anticorpo anti-BpLec foi empregado na marcação de BpLec em ensaio de imunofluorescência. Após a análise da marcação parasitária por várias concentrações de BpLec, verificou-se que todas eficientemente marcaram a membrana parasitária (dados não-mostrados) e a concentração de 20 µg foi a escolhida para as repetições seguintes. O tratamento com BpLec (20 µg) resultou na marcação da membrana dos taquizoítos não permeabilizados (Fig. 8A), enquanto um controle utilizando-se apenas anticorpo anti-BpLec resultou em nenhuma marcação (Fig. 8B). Tal controle mostra que a marcação vista no tratamento por BpLec refere-se a uma interação da toxina com o parasito, excluindo-se reações inespecíficas pelo anticorpo. Para confirmar a eficiência da reação, um controle utilizando-se soro de camundongo infectado por *T. gondii* também foi empregado, mostrando-se uma forte marcação parasitária. Adicionalmente, para excluir um possível reconhecimento das estruturas parasitárias pelo anticorpo secundário (anti-mouse conjugado com FITC), um controle utilizando-se soro de camundongo não infectado também foi feito, no qual não foi evidenciada nenhuma marcação.

Uma vez que BpLec reconheceu estruturas do parasito intacto, possivelmente glicoconjugados presentes na membrana parasitária, as lâminas foram incubadas em Triton X-100 0,01% (v/v) em PBS, com o intuito de se romper a membrana parasitária por permeabilização, possibilitando o reconhecimento de estruturas internas dos taquizoítos. Uma leve marcação foi vista após o tratamento dos poços com 20 µg de BpLec (Fig. 8E), porém bastante semelhante à marcação discreta também observada para o anticorpo anti-BpLec (Fig. 8F), sugerindo que BpLec possivelmente apresenta pouca ou nenhuma marcação de

estruturas internas do parasito. O controle com soro de camundongo infectado com *T. gondii* mostrou uma forte marcação (Fig. 8G), confirmando a eficiência da reação, enquanto o soro de camundongo não-infectado não marcou as estruturas parasitárias (Fig. 8H). Sendo assim, os dados de microscopia por fluorescência revelaram que BpLec reconhece a membrana dos taquizoítos de *T. gondii* e aparentemente apresenta baixa interação com estruturas internas do parasito.

Interessantemente, Luo e colaboradores (2011) mostraram que lectinas vegetais são capazes de reconhecer tanto taquizoítos permeabilizados quanto taquizoítos não permeabilizados, na mesma proporção. Tal divergência pode estar relacionada à quantidade de lectina utilizada nos tratamentos de cada trabalho, assim como pode ser devido às diferentes especificidades e reconhecimentos que lectinas vegetais e animais podem apresentar. Por outro lado, a descoberta de glicosilação de estruturas internas dos taquizoítos é um fato recente e bastante controverso na literatura, enquanto relatos de que a membrana parasitária é enriquecida por glicoproteínas estão em maior evidência (LUO et al., 2011). Ainda mais, a membrana parasitária possui um grande número de microdomínios de membrana constituídos principalmente por glicoconjugados contendo N-acetil-D-glicosamina (TOMAVO et al., 1992; ODENTHAL-SCHNITTLER et al., 1993), um açúcar reconhecido por BpLec, (CASTANHEIRA et al. 2013). Portanto, o presente trabalho abre novas perspectivas sobre uma busca de antígenos parasitários que seriam reconhecidos por BpLec, sobretudo aqueles relacionados à inibição da adesão e proliferação aqui descrita, sugerindo potenciais alvos terapêuticos. Adicionalmente, estudos estruturais demonstrando a interação de BpLec com os alvos específicos também podem ser bastante relevantes na caracterização bioquímica e funcional de BpLec, correlacionando as regiões estruturais da toxina que participam de tal interação.

4. Conclusões

BpLec mostrou-se de grande interesse clínico visto que pequenas concentrações da toxina não foram citotóxicas tanto para a célula hospedeira quanto para o parasito, mas interferiram nas funções parasitárias, quando taquizoítos foram tratados previamente à infecção. Portanto, BpLec é uma ferramenta bastante promissora na busca de proteínas parasitárias relacionadas

com a adesão e a proliferação de taquizoítos de *Toxoplasma gondii*, apontando possíveis alvos para uma futura terapia adicional.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem gentilmente ao apoio técnico do Instituto de Genética e Bioquímica (INGEB/UFU) e do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM/UFU) da Universidade Federal de Uberlândia. Também agradecemos ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

6. Conflitos de interesse

Os autores atestam que não há nenhum potencial conflito de interesse e todos contribuíram para a pesquisa e coleta de dados, preparação do manuscrito e aprovação da versão final. (Vide anexo)

7. Referências bibliográficas

ADADE, C. M.; CONS, B. L.; MELO, P. A.; SOUTO-PADRÓN, T. Effect of *Crotalus viridis viridis* snake venom on the ultrastructure and intracellular survival of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**. v. 138, nº 1, p. 46-58, 2011.

ALDEBERT, D.; HYPOLITE, M.; CAVAILLES, P.; TOUQUET, B.; FLORI, P.; LOEUILLET, C.; CESBRON-DELAUW, M. F. Development of high-throughput methods to quantify cysts of *Toxoplasma gondii*. **Cytometry A**. v. 79, nº 11, p. 952-8, 2011.

AWANDARE, G.A.; HITTNER, J.B.; KREMSNER, P.G.; OCHIEL, D.O.; KELLER, C.C.; WEINBERG, J.B.; CLARK, I.A.; PERKINS, D.J. Decreased circulating macrophage migration inhibitory factor (MIF) protein and blood mononuclear cell MIF transcripts in children with *Plasmodium falciparum* malaria. **Clin Immunol**. v. 119, p. 219-25, 2006.

BARBOSA, B. F.; SILVA, D. A. O.; COSTA, I. N.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. **Clin Exp Immunol.** v. 151, p. 536–545, 2008.

BARBOSA, P. S. F.; MARTINS, A. M. C.; TOYAMA, M. H.; JOAZEIRO, P.P.; BERIAM, L. O. S.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Purification and biological effects of a C-type lectin isolated from *Bothrops moojeni*. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases.** v. 16, p. 493-504, 2010.

BASTOS, L. M.; JÚNIOR, R. J.; SILVA, D. A.; MINEO, J. R.; VIEIRA, C. U.; TEIXEIRA, D. N.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; RODRIGUES, V. M.; HAMAGUCHI, A. *Toxoplasma gondii*: effects of neuwiedase, a metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* snake venom, on the invasion and replication of human fibroblasts in vitro. **Exp Parasitol.** v. 120, p. 391-6, 2008.

BHATTACHARYA, S.; GHOSH, P.; DE, T.; GOMES, A.; GOMES, A.; DUNGDUNG, S. R. In vivo and in vitro antileishmanial activity of *Bungarus caeruleus* snake venom through alteration of immunomodulatory activity, **Exp Parasitol.** v. 135, p. 126-33, 2013.

BÉLA, S. R.; OLIVEIRA SILVA, D. A.; CUNHA-JÚNIOR, J. P.; PIROVANI, C. P.; CHAVES-BORGES, F. A.; REIS DE CARVALHO, F; CARRIJO DE OLIVEIRA, T.; MINEO, J. R. Use of SAG2A recombinant *Toxoplasma gondii* surface antigen as a diagnostic marker for human acute toxoplasmosis: analysis of titers and avidity of IgG and IgG1 antibodies. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v. 62, nº 3, p. 245-54, 2008.

BERNARDES, E. S.; SILVA, N. M.; RUAS, L. P.; MINEO, J. R.; LOYOLA, A. M.; HSU, D. K.; LIU, F. T.; CHAMMAS, R.; ROQUE-BARREIRA, M.C. *Toxoplasma gondii* infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity. **Am J Pathol.** v. 168, p. 1910-20, 2006.

BRADFORD, M. M, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** v. 7, p, 248-254, 1976.

CARNEIRO, A. C.; ANDRADE, G. M.; COSTA, J. G.; PINHEIRO, B. V.; VASCONCELOS-SANTOS, D. V.; FERREIRA, A. M.; SU, C.; JANUÁRIO, J. N.; VITOR, R. W. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* revealed highly diverse genotypes for isolates from newborns with congenital toxoplasmosis in southeastern Brazil. **J Clin Microbiol.** v. 51, p. 901-7, 2013.

CARVALHO, J. V.; ALVES, C. M.; CARDOSO, M. R.; MOTA, C. M.; BARBOSA, B. F.; FERRO, E. A.; SILVA, N. M.; MINEO, T. W.; MINEO, J. R.; SILVA, D. A. Differential susceptibility of human trophoblastic (BeWo) and uterine cervical (HeLa) cells to *Neospora caninum* infection. **Int J Parasitol.** v. 40, p. 1629-37, 2010.

CASTANHEIRA, L. E.; NUNES, D. C.; CARDOSO, T. M.; SANTOS, P. DE S.; GOULART, L. R.; RODRIGUES, R. S.; RICHARDSON, M.; BORGES, M. H.; YONEYAMA, K. A.; RODRIGUES, V.M. Biochemical and functional characterization of a C-type lectin (BpLec) from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Int J Biol Macromol.** v. 54, p. 57-64, 2013.

CASTRO, A. S.; ALVES, C. M.; ANGELONI, M. B.; GOMES, A. O.; BARBOSA, B. F.; FRANCO, P. S.; SILVA, D. A.; MARTINS-FILHO, O. A.; MINEO, J. R.; MINEO, T. W.; FERRO, E.A. Trophoblast cells are able to regulate monocyte activity to control *Toxoplasma gondii* infection. **Placenta.** v. 34, p. 240-7, 2013.

CECILIO, A. B.; CALDAS, S.; OLIVEIRA, R. A.; SANTOS, A. S.; RICHARDSON, M.; NAUMANN, G. B.; SCHNEIDER, F. S.; ALVARENGA, V. G.; ESTEVÃO-COSTA, M. I.; FULY, A. L.; EBLE, J. A.; SANCHEZ, E.F. Molecular characterization of Lys49 and Asp49 phospholipases A₂ from snake venom and their antiviral activities against Dengue virus, **Toxins (Basel).** v. 5, p. 1780-98, 2013.

CHE, F. Y.; MADRID-ALISTE, C.; BURD, B.; ZHANG, H.; NIEVES, E.; KIM, K.; FISER, A.; ANGELETTI, R. H.; WEISS, L. M. Comprehensive proteomic analysis of membrane proteins in *Toxoplasma gondii*. **Mol Cell Proteomics**. v. 10, p. M110.000745, 2011.

CLEMETSON, K. J.; MORITA, T.; MANJUNATHA KINI, R. Scientific and standardization committee communications: classification and nomenclature of snake venom C-type lectins and related proteins. **J Thromb Haemost**. v. 7, p. 360, 2009.

COSTA, T. R.; MENALDO, D. L.; PRINHOLATO, D. A.; SILVA, C.; SORRECHIA, R.; DE ALBUQUERQUE, S.; PIETRO, R. C.; GHISLA, S.; ANTUNES, L. M.; SAMPAIO, S. V. Evaluating the microbicidal, antiparasitic and antitumor effects of CR-LAAO from *Calloselasma rhodostoma* venom. **Int J Biol Macromol**. v. 80, p. 489-97, 2015.

DE LIMA, L.P.; SEABRA, S.H.; DE OLIVEIRA, H.C.; BARBOSA, H. S. Effect of 3-Bromopyruvate and Atovaquone on Infection during In Vitro Interaction of *Toxoplasma gondii* and LLC-MK2 Cells. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 59, nº 9, p. 5239-49, 2015.

DEOLINDO, P.; TEIXEIRA-FERREIRA, A. S.; DAMATTA, R. A.; ALVES, E. W. L-amino acid oxidase activity present in fractions of *Bothrops jararaca* venom is responsible for the induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*. **Toxicon**. v. 56, nº 6, p. 944-55, 2010.

DUBEY, J. P. History of the discovery of the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol**. v. 39, nº 8, p. 877-82, 2009.

DUBEY, J. P.; LAGO, E. G.; GENNARI, S. M.; SU, C.; JONES, J. L. Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology. **Parasitology**. v. 139, p. 1375-424, 2012.

DUBREMETZ, J. F.; LEBRUN, M. Virulence factors of *Toxoplasma gondii*. **Microbes Infect.** v. 14, p. 1403-10, 2012.

DZIERSZINSKI, F.; MORTUAIRE, M.; CESBRON-DELAUW, M. F.; TOMAVO, S. Targeted disruption of the glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigen SAG3 gene in *Toxoplasma gondii* decreases host cell adhesion and drastically reduces virulence in mice. **Mol Microbiol.** v. 37, p. 574-82, 2000.

EL CHAMY MALUF, S.; DAL MAS, C.; OLIVEIRA, E. B.; MELO, P. M.; CARMONA, A. K.; GAZARINI, M. L.; HAYASHI, M. A. Inhibition of malaria parasite *Plasmodium falciparum* development by crodamine, a cell penetrating peptide from the snake venom. **Peptides.** v. 78, p. 11-6, 2016.

FAUQUENOY, S.; MORELLE, W.; HOVASSE, A.; BEDNARCZYK, A.; SLOMIANNY, C.; SCHAEFFER, C.; VAN DORSSELAER, A.; TOMAVO, S. Proteomics and glycomics analyses of N-glycosylated structures involved in *Toxoplasma gondii*-host cell interactions. **Mol Cell Proteomics.** v. 7, p. 891-910, 2008.

FIGUEIREDO, J. F.; SILVA, D. A.; CABRAL, D. D.; MINEO, J. R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in goats by the indirect haemagglutination, immunofluorescence and immunoenzymatic tests in the region of Uberlândia, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 96, nº 5, p. 687-92, 2001.

FLORES, M.; SAAVEDRA, R. L.; BAUTISTA, R.; VIEDMA, R.; TENORIO, E. P.; LENG, L.; SÁNCHEZ, Y.; JUÁREZ, I.; SATOSKAR, A. A.; SHENOY, A. S.; TERRAZAS, L. I.; BUCALA, R.; BARBI, J.; SATOSKAR, A. R.; RODRIGUEZ-SOSA, M. **FASEB J.** v. 22, p. 3661–3671, 2008.

FRENKEL, J. K.; DUBEY, J. P.; MILLER, N. L. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. **Science.** v. 167, nº 3919, p. 893-6, 1970.

GILBERT, R. E.; FREEMAN, K.; LAGO, E. G.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; TAN, H. K.; WALLON, M.; BUFFOLANO, W.; STANFORD, M. R.; PETERSEN, E. Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 2, p. e277, 2008.

GOMES, A.; BHATTACHARJEE, P.; MISHRA, R.; BISWAS, A. K.; DASGUPTA, S. C.; GIRI, B. Anticancer potential of animal venoms and toxins. **Indian J Exp Biol**. v. 48, p. 93-103, 2010.

HIRABAYASHI, J.; KUNO, A.; TATENO, H. Lectin-based structural glycomics: a practical approach to complex glycans. **Electrophoresis**. v. 32, p. 1118-28, 2011.

KAYANO, A. M.; SIMÕES-SILVA, R.; MEDEIROS, P. S.; MALTAROLLO, V. G.; HONORIO, K. M.; OLIVEIRA, E.; ALBERICIO, F.; DA SILVA, S. L.; AGUIAR, A. C.; KRETTLI, A. U.; FERNANDES, C. F.; ZULIANI, J. P.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M. BbMP-1, a new metalloproteinase isolated from *Bothrops brazili* snake venom with in vitro antiplasmodial properties. **Toxicon**. v. 106, p. 30-41, 2015.

KINI, R. M. Toxins in thrombosis and haemostasis: potential beyond imagination. **J Thromb Haemost**. v. 1, p. 195-208, 2011.

KLEIN, R. C.; FABRES-KLEIN, M. H.; DE OLIVEIRA, L. L.; FEIO, R. N.; MALOUIN, F.; RIBON, A. DE O. A C-type lectin from *Bothrops jararacussu* venom disrupts Staphylococcal biofilms. **PLoS One**. v. 10, nº 3, p. e0120514, 2015.

LAEMMLI, U. K.. Cleavage of structural proteins, during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680-289, 1970.

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

LUK, F. C.; JOHNSON, T. M.; BECKERS, C. J. N-linked glycosylation of proteins in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **Mol Biochem Parasitol.** v. 157, n° 2, p. 169-78, 2008.

LUO, Q.; UPADHYA, R.; ZHANG, H.; MADRID-ALISTE, C.; NIEVES, E.; KIM, K.; ANGELETTI, R. H.; WEISS, L. M. Analysis of the glycoproteome of *Toxoplasma gondii* using lectin affinity chromatography and tandem mass spectrometry. **Microbes Infect.** v. 14-15, p. 1199-210, 2011.

MA, G. Y.; ZHANG, J. Z.; YIN, G. R.; ZHANG, J. H.; MENG, X. L.; ZHAO, F. *Toxoplasma gondii*: proteomic analysis of antigenicity of soluble tachyzoite antigen. **Exp Parasitol.** v. 122, p. 41-6, 2009.

MATRAJT, M.; DONALD, R. G.; SINGH, U.; ROOS, D. S. Identification and characterization of differentiation mutants in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. **Mol Microbiol.** v. 44, n° 3, p. 735-47, 2002.

MELO, M. B.; JENSEN, K. D.; SAEIJ, J. P. *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. **Trends Parasitol.** v. 27, p. 487-95, 2011.

MINEO, J. R.; KASPER, L. H. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves major surface protein, SAG-1 (P30). **Exp Parasitol.** v. 79, p. 11–20, 1994.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet.** v. 363, p. 1965-76, 2004.

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

NAMANGALA, B.; INOUE, N.; SUGIMOTO, C. Preliminary studies on the effects of orally-administered Transforming Growth Factor-beta on protozoan diseases in mice. **Jpn J Vet Res.** v. 57, p. 101-8, 2009.

NUNES, D. C.; FIGUEIRA, M. M.; LOPES, D. S.; DE SOUZA, D. L.; IZIDORO, L. F.; FERRO, E. A.; SOUZA, M. A.; RODRIGUES, R. S.; RODRIGUES, V. M.; YONEYAMA, K. A. BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A2 from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Parasitology.** v. 140, nº 7, p. 844-54, 2013.

NUNES, E. DOS S.; DE SOUZA, M. A.; VAZ, A. F.; SANTANA, G. M.; GOMES, F. S.; COELHO, L. C.; PAIVA, P. M.; DA SILVA, R. M.; SILVA-LUCCA, R. A.; OLIVA, M. L.; GUARNIERI, M. C.; CORREIA, M. T. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.** v. 159, nº 1, p. 57-63, 2011.

ODENTHAL-SCHNITTLER, M.; TOMAVO, S.; BECKER, D.; DUBREMETZ, J. F.; SCHWARZ, R. T. Evidence for N-linked glycosylation in *Toxoplasma gondii*. **Biochem J.** v. 291, p. 713-21, 1993.

OLIVEIRA, J. G.; SILVA, N. M.; SANTOS, A. A.; SOUZA, M. A.; FERREIRA, G. L.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. BeWo trophoblasts are unable to control replication of *Toxoplasma gondii*, even in the presence of exogenous IFN-gamma. **Placenta.** v. 27, p. 691-8, 2006.

OMER, F. M.; KURTZHALS, J. A.; RILEY, E. M. Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF-beta?. **Parasitol Today.** v. 16, p. 18-23, 2000.

PASSERO L. F.; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E.; LAURENTI, M. D.; TOYAMA, M. H. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus* ssp. venoms. **Parasitol Res.** v. 101, nº 5, p. 1365-71, 2007.

PORTES, J. DE A.; NETTO, C. D.; DA SILVA, A. J.; COSTA, P. R.; DAMATTA, R. A.; DOS SANTOS, T. A.; DE SOUZA, W.; SEABRA, S. H. A new type of pterocarpanquinone that affects *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vitro. **Vet Parasitol.** v. 186, p. 261-9, 2012.

RABELO, L.; MONTEIRO, N.; SERQUIZ, R.; SANTOS, P.; OLIVEIRA, R.; OLIVEIRA, A.; ROCHA, H.; MORAIS, A. H.; UCHOA, A.; SANTOS, E. A lactose-binding lectin from the marine sponge *Cinachyrella apion* (Cal) induces cell death in human cervical adenocarcinoma cells. **Mar Drugs.** v. 10, p. 727-43, 2012.

ROSADO, J. DE D.; RODRIGUEZ-SOSA, M. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a key player in protozoan infections. **Int J Biol Sci.** v. 7, p. 1239-56, 2011.

ROUG, A. S.; LARSEN, H. O.; NEDERBY, L.; JUST, T.; BROWN, G.; NYVOLD, C. G.; OMMEN, H. B.; HOKLAND, P. hMICL and CD123 in combination with a CD45/CD34/CD117 backbone - a universal marker combination for the detection of minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. **Br J Haematol.** v. 164, p. 212-22, 2014.

SAFFER, L. D.; LONG KRUG, S. A.; SCHWARTZMAN, J. D. The role of phospholipase in host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. **Am J Trop Med Hyg.** v. 40, nº 2, p. 145-9, 1989.

SANTOS, J. M.; SOLDATI-FAVRE, D. Invasion factors are coupled to key signalling events leading to the establishment of infection in apicomplexan parasites. **Cell Microbiol.** v. 13, p. 787-96, 2011.

SIBLEY, L. D.; MORDUE, D.; HOWE, D. K. Experimental approaches to understanding virulence in toxoplasmosis. **Immunobiology.** v. 201, nº 2, p. 210-24, 1999.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Curr Protoc Immunol**. Appendix 3, Appendix 3B, 2001.

SUZUKI, Y. Genes, cells and cytokines in resistance against development of toxoplasmic encephalitis. **Immunobiology**. v. 201, p. 255-71, 1999.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int J Parasitol**. v. 30, nº 12-13, p. 1217-58, 2000.

TEO, C. F.; ZHOU, X. W.; BOGYO, M.; CARRUTHERS, V. B. Cysteine protease inhibitors block *Toxoplasma gondii* microneme secretion and cell invasion. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 51, p. 679-88, 2007.

TERRA, A. L.; MOREIRA-DILL, L. S.; SIMÕES-SILVA, R.; MONTEIRO, J. R.; CAVALCANTEM W. L.; GALLACCI, M.; BARROS, N. B.; NICOLETE, R.; TELES, C. B.; MEDEIROS, P. S.; ZANCHI, F. B.; ZULIANI, J. P.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M. Biological characterization of the Amazon coral *Micrurus spixii* snake venom: Isolation of a new neurotoxic phospholipase A₂. **Toxicon**. v. 103, p. 1-11, 2015.

TERRAZAS, C. A.; JUAREZ, I.; TERRAZAS, L. I.; SAAVEDRA, R.; CALLEJA, E. A.; RODRIGUEZ-SOSA, M. *Toxoplasma gondii*: impaired maturation and pro-inflammatory response of dendritic cells in MIF-deficient mice favors susceptibility to infection. **Exp Parasitol**. v. 126, p. 348-58, 2010.

TOMAVO, S.; DUBREMETZ, J. F.; SCHWARZ, R. T. Biosynthesis of glycolipid precursors for glycosylphosphatidylinositol membrane anchors in a *Toxoplasma gondii* cell-free system. **J Biol Chem**. v. 267, nº 30, p. 21446-58, 1992.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 76, nº 9, p. 4350-4, 1979.

UTARABHAND, P.; RIITIDACH, W.; PAIJIT, N. Bacterial agglutination by sialic acid-specific lectin in the hemolymph of the banana shrimp *Penaeus (Fenneropenaeus) merguensis*. **Sci. Asia**. v. 33, p. 41- 46, 2007.

WALKER, J. M. The Protein Protocol Handbook. **Human Press Journal**. p. 695-698, 1996.

XIE, M.; HU, J.; LONG, Y. M.; ZHANG, Z. L.; XIE, H. Y.; PANG, D.W. Lectin-modified trifunctional nanobiosensors for mapping cell surface glycoconjugates. **Biosens Bioelectron**. v. 24, p. 1311-7, 2009.

Tabela 1: Viabilidade de taquizoítos de *T. gondii* tratados com BpLec, determinada por exclusão por azul de tripan.

Tratamento	Viabilidade celular (%)
------------	-------------------------

Controle (RPMI)	100
BpLec 2,5 µg/mL	100
BpLec 5 µg/mL	100
BpLec 10 µg/mL	100

Figuras

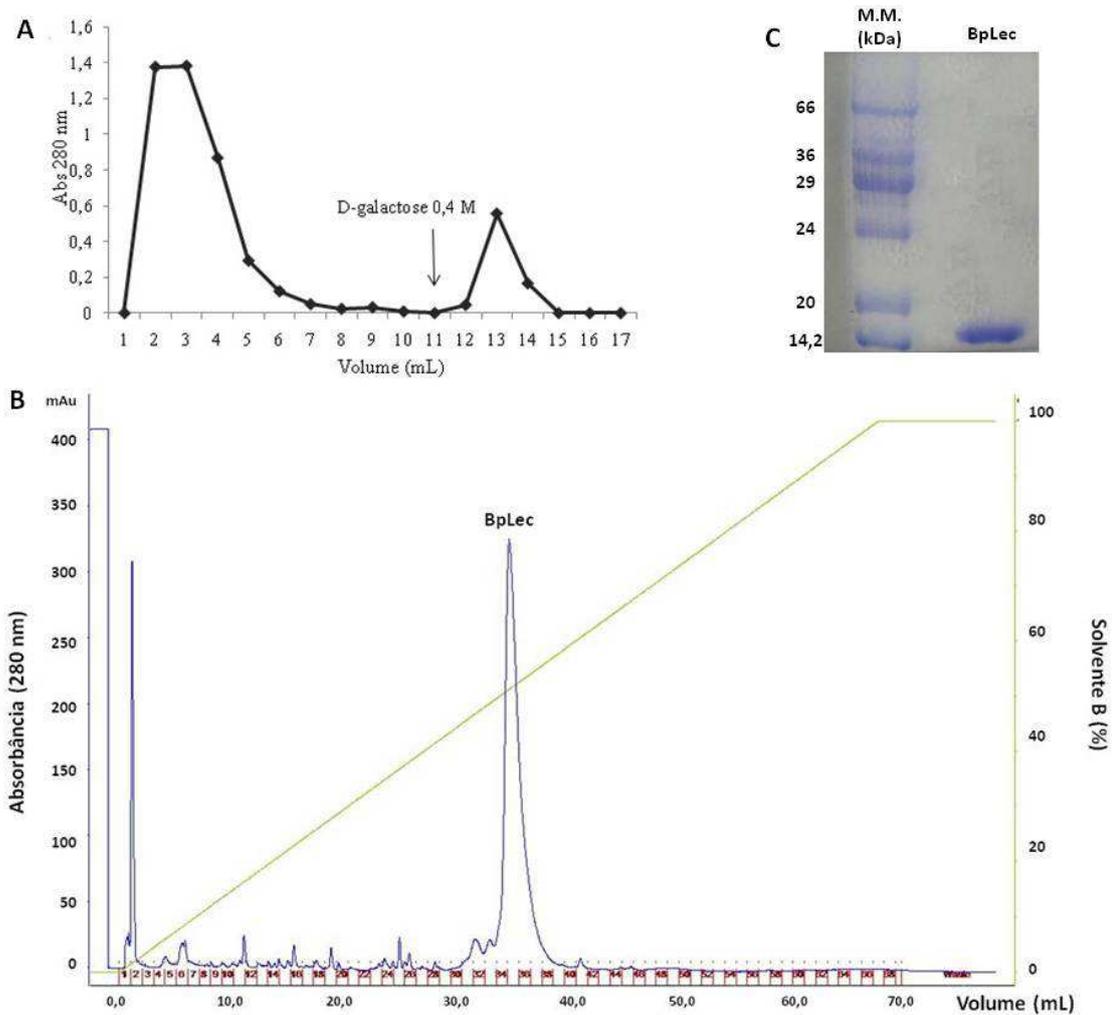


Figura 1: Isolamento de BpLec e caracterização bioquímica. Purificação de BpLec por cromatografia de afinidade em resina de Agarose imobilizada com D-galactose (0,5 x 4 cm, Pierce, EUA), equilibrada e inicialmente eluída com tampão CTBS (NaCl 150 mM, Tris 20 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,4), seguida da adição de D-galactose 400 mM para a eluição de BpLec (A). Cromatografia em fase reversa utilizando-se a coluna C18 (2,0 x 2,5 cm, GE Health Care, Suécia), equilibrada com solvente A (ácido trifluoroacético 0,1% e acetonitrila 5%) e eluída em concentração gradiente de solvente B (acetonitrila 80% e ácido trifluoroacético 0,1%) de 0 a 100%, num fluxo de 0,5 mL/min a temperatura ambiente (B). SDS-PAGE a 12,5% (C). M.M.: marcadores de massa molecular (Amersham Bioscience).

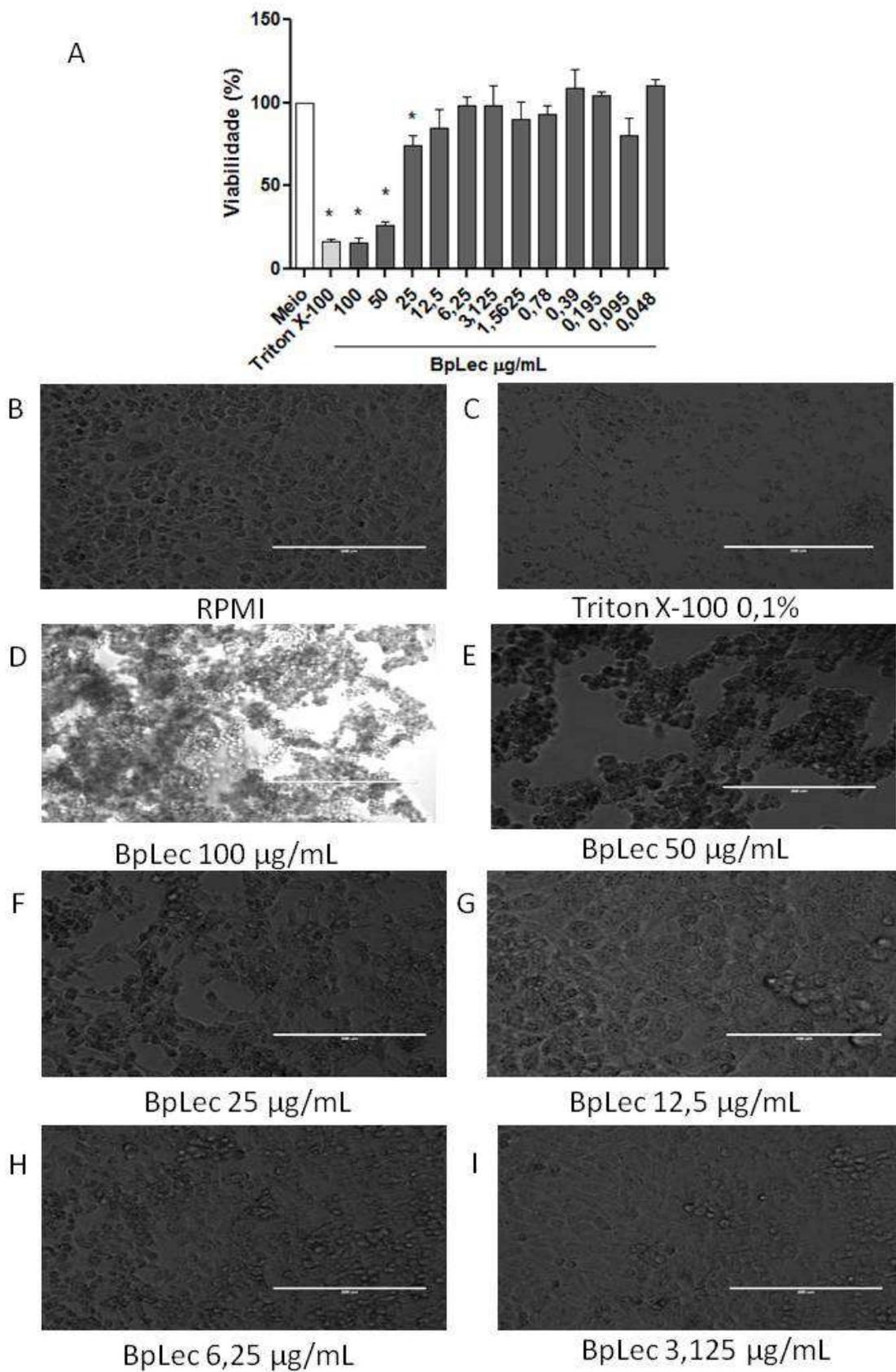


Figura 2: Efeitos de BpLec sobre a viabilidade de HeLa testados pelo método do MTT. Triton X-100 foi usado como controle positivo e meio RPMI como controle

negativo de morte celular. (*) representa diferenças estatisticamente significantes entre o controle negativo (RPMI) e os tratamentos com Triton X-100 (0,1%, m/v) e diferentes concentrações de BpLec ($p < 0,05$; ANOVA) (A). Fotomicrografias de células HeLa mostradas por microscopia óptica sob ampliação de 40 vezes após o tratamento celular com RPMI (B), Triton X-100 0,1% (C) e BpLec (100 a 3,125 $\mu\text{g/mL}$) (D, F, G, H e I).

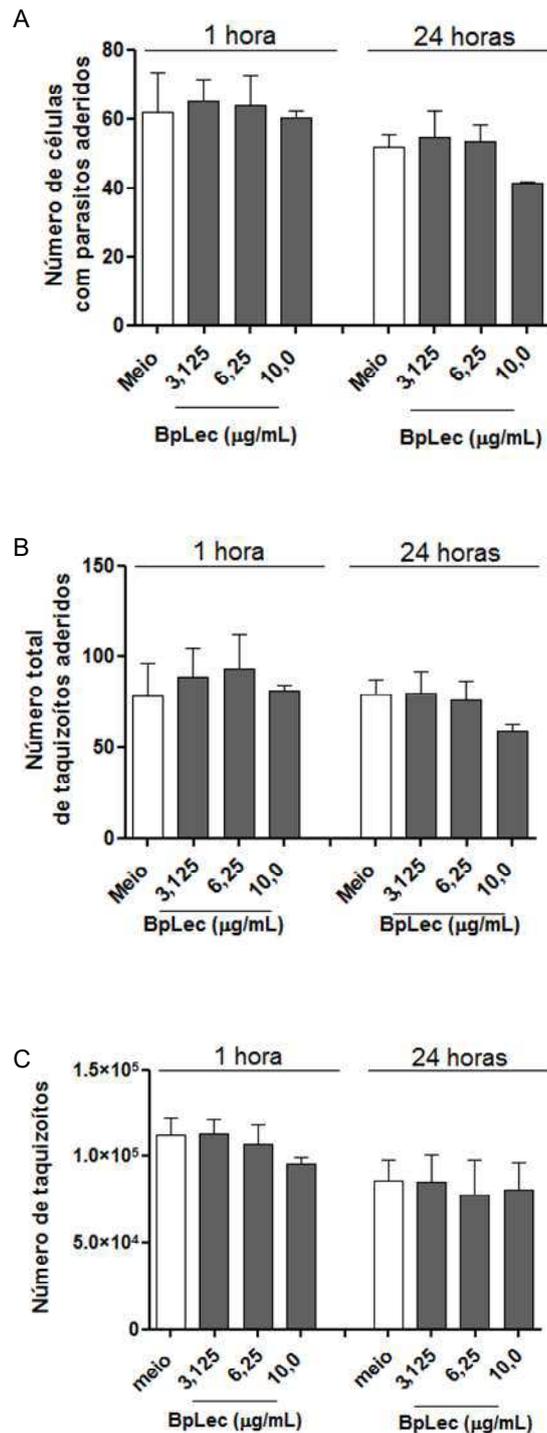


Figura 3: Ação de BpLec sobre a adesão de *T. gondii* (A e B) e proliferação (C) após o tratamento das células hospedeiras (HeLa) durante 1 ou 24 horas previamente à infecção com tachizoítos. (*) representa diferenças estatisticamente significantes entre células tratadas com meio (RPMI) e BpLec ($p < 0,05$; ANOVA).

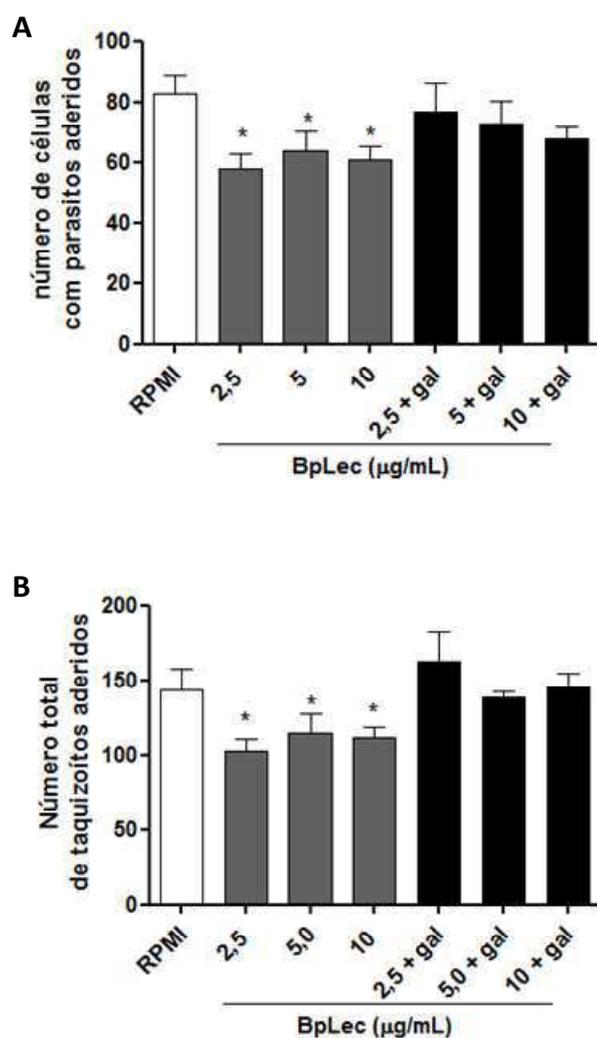


Figura 4: Adesão de taquizoítos de *T. gondii* tratados com BpLec à célula hospedeira (HeLa). Dois parâmetros foram avaliados: número de células HeLa com parasitos aderidos (A) e número total de parasitos aderidos a essas células (B), determinados em um total de 200 células HeLa por lamínula. Parasitos cultivados apenas com meio RPMI, na ausência de BpLec, foram considerados como controles. BpLec foi também incubada com galactose 400 mM, previamente ao tratamento do parasito. (*) representa diferenças estatisticamente significantes entre o controle RPMI e os tratamentos com BpLec inibida ou não por D-galactose 400 mM ($p < 0,05$; ANOVA).

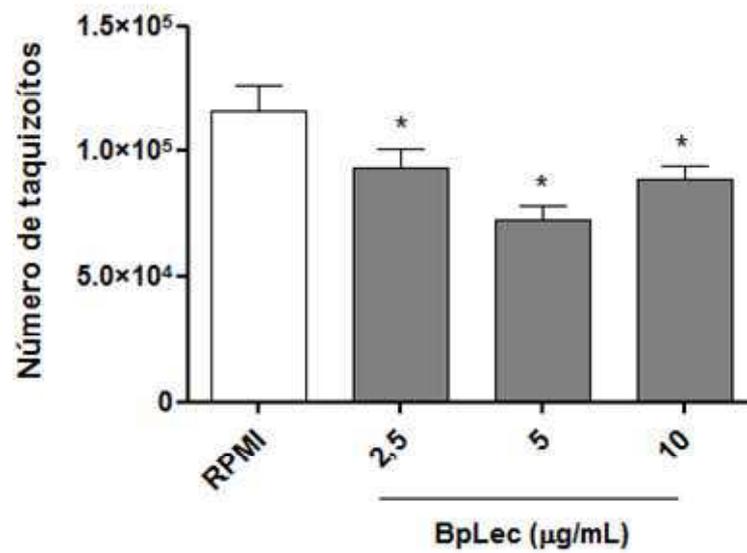


Figura 5: Proliferação de taquizoítos de *T. gondii* tratados com BpLec. O número total de parasitos foi estimado pela mensuração da enzima β -galactosidase 24 horas após a infecção. Controle com parasitos tratados com RPMI na ausência de BpLec foi utilizado. (*) representa diferenças estatisticamente significantes entre os tratamentos com RPMI e BpLec ($p < 0,05$; ANOVA).

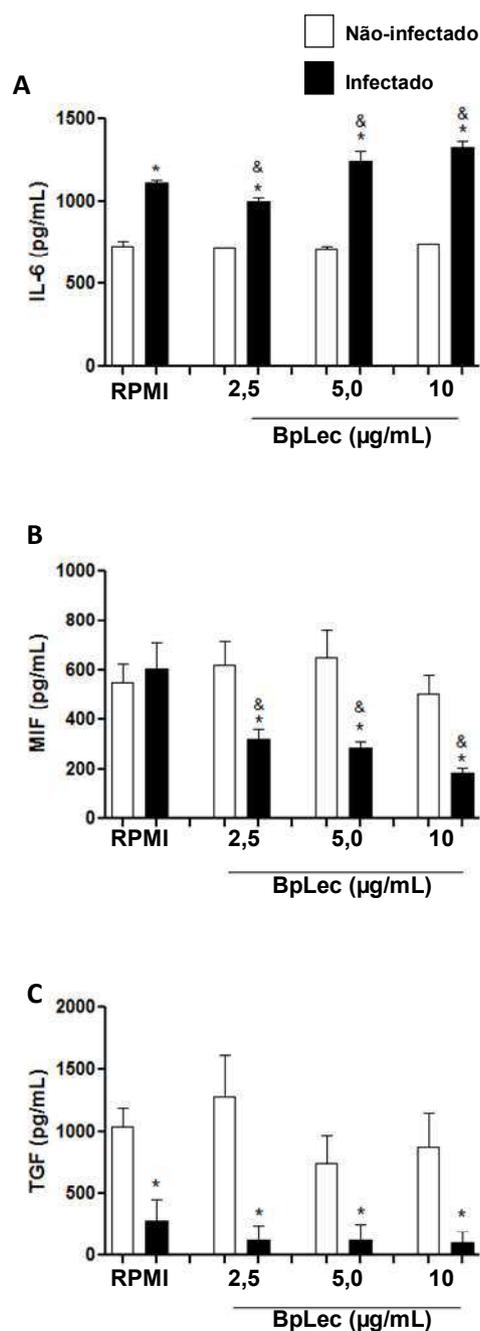


Figura 6: Produção de citocinas por células HeLa infectadas ou não infectadas com taquizóitos tratados com BpLec. A produção basal de citocinas (controle não infectado) foi avaliada pelo tratamento de HeLa com as mesmas concentrações de BpLec utilizadas no tratamento do parasito, sendo mostradas por barras brancas. Barras pretas correspondem à produção de citocinas pelas células HeLa após a infecção por taquizóitos previamente tratados com BpLec. As produções de (A) IL-6, (B) MIF e (C) TGF- β 1 foram mensuradas por ELISA (BD Biosciences,

San Jose, California, EUA). Diferenças estatisticamente significantes entre células infectadas e não infectadas estão indicadas por (*); diferenças estatisticamente significantes entre o controle RPMI e o taquizoítos tratados com BpLec estão indicadas por (&) ($p < 0,05$; ANOVA).

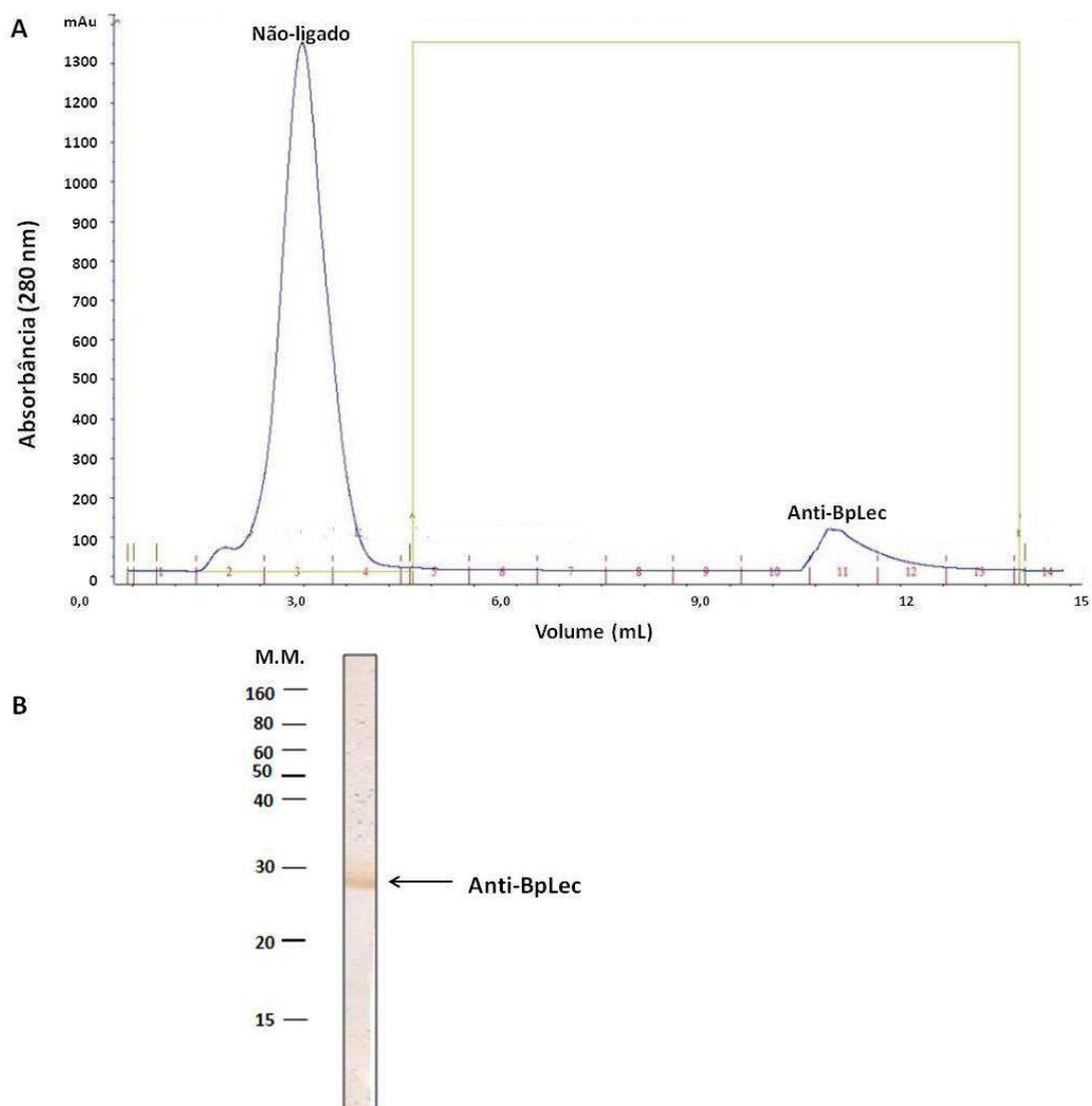


Figura 7: Obtenção e validação de reconhecimento do anticorpo anti-BpLec. Purificação das imunoglobulinas G obtidas do soro de camundongos foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna proteína G HiTrap (1,6 x 2,5 cm) no sistema Äkta Prime Plus (GE HealthCare, Suécia), previamente equilibrada com Tris HCl 100 mM contendo NaCl 150 mM pH 7,5, sendo a eluição realizada na mesma solução, num fluxo de 0,5 mL/min a temperatura ambiente, coletando-se 1

mL por tubo. A amostra contendo o anticorpo anti-BpLec foi eluída após gradiente em 100% de glicina 100 mM pH 2,7, representado pela linha verde (A). *Immunoblot* preparado com antígeno BpLec (30 µg), separado por SDS-PAGE (gel a 12%) e eletrotransferido para membrana de nitrocelulose. A seta indica a marcação da reação com anticorpo anti-BpLec. M.M.: marcadores de massa molecular (ThermoScientific) (B).

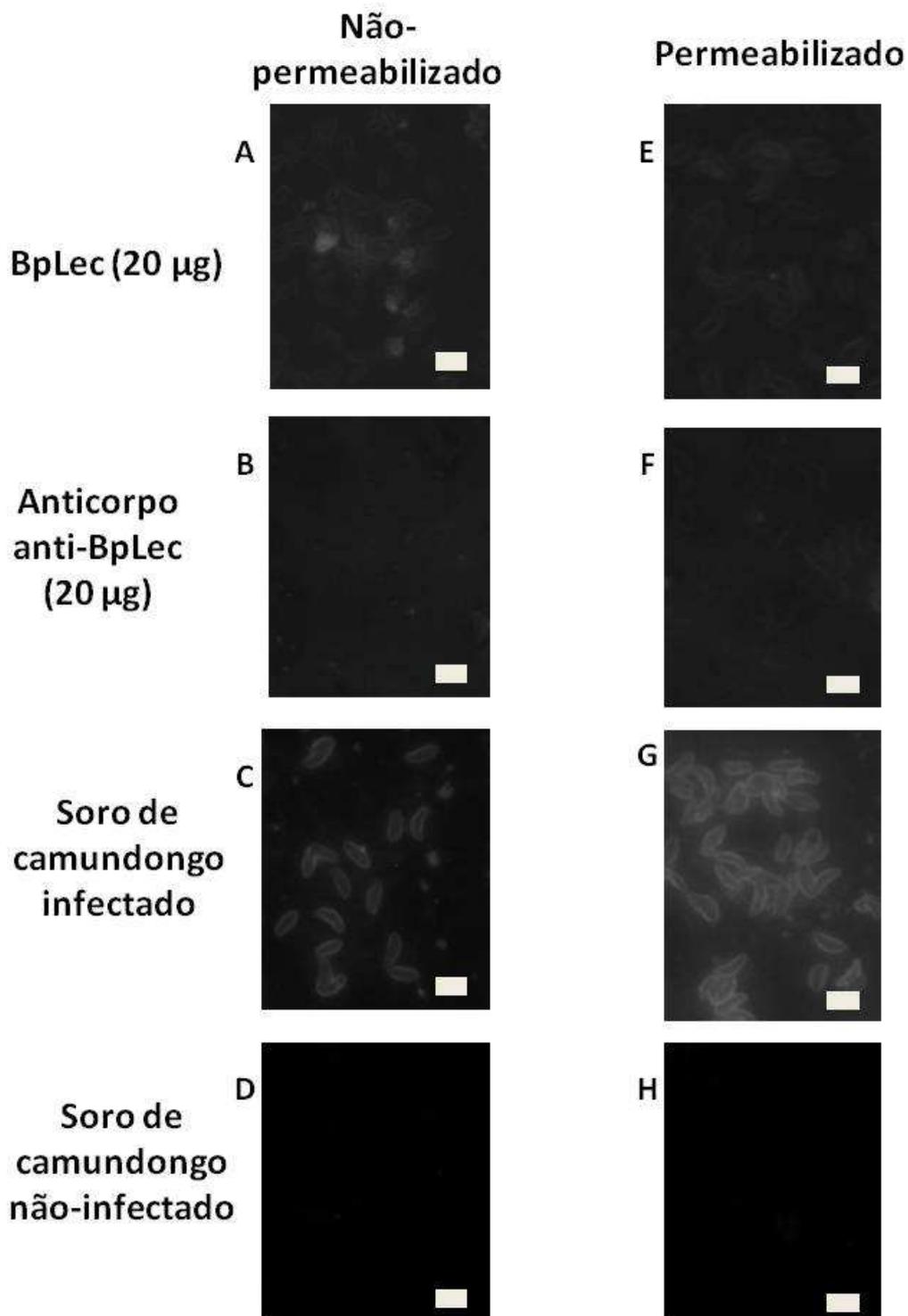


Figura 8: Fotomicrografias de taquizoítos de *T. gondii* obtidas por microscopia de fluorescência. As lâminas foram permeabilizados por incubação de 30 minutos em solução Triton X-100 0,1% (v/v) em PBS ou não permeabilizadas. A marcação das estruturas parasitárias pelos seguintes controles e tratamentos foi avaliada:

BpLec (A e E), anticorpo anti-BpLec (B e F), soro de camundongo infectado (C e G) e soro de camundongo não infectado (D e H). Escala das barras: 6,5 μm .

Capítulo 3: Efeitos de uma lectina tipo-C isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis* (BpLec) sobre modelos de angiogênese *in vitro* e *in vivo*

Resumo: No presente trabalho apresentamos os efeitos de BpLec, uma lectina tipo-C isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*, sobre modelos de angiogênese *in vitro* e *in vivo* avaliados por ensaios de formação de vasos em Matrigel e por quantificação de alguns componentes da angiogênese inflamatória induzida por esponjas sintéticas de poliéster poliuretano implantadas no dorso de camundongos, respectivamente. Inicialmente foi demonstrado que BpLec não apresentou citotoxicidade sobre células tEnd em concentrações até 40 µg/mL; no entanto, em concentrações subtóxicas (2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL e 20 µg/mL), BpLec foi capaz de reduzir a adesão celular a alguns componentes da matriz extracelular e inibir a formação de vasos *in vitro*. β-galactosídeos (D-lactose, N-acetil-D-galactosamina e D-galactose) a 400 mM reverteram a inibição da adesão de células tEnd induzida por BpLec, ao passo que D-galactose (400 mM) reverteu parcialmente a capacidade de BpLec em inibir a formação de vasos por células tEnd em Matrigel. O tratamento com BpLec induziu um aumento na concentração de hemoglobina e no número de vasos sanguíneos presentes nos implantes sintéticos introduzidos subcutaneamente no dorso de camundongos, bem como reduziu a deposição de colágeno solúvel e de colágeno tipo I e tipo III intrainplante, além de induzir uma diminuição na secreção de algumas citocinas inflamatórias, como IL-6, TNF-α e proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1). Por outro lado, BpLec não apresentou efeitos sobre outros marcadores inflamatórios, como atividades das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-D-glicosaminidase (NAG). Nossos resultados apontam que BpLec é capaz de modular a angiogênese *in vitro* e *in vivo*, seja por inibição ou estímulo desse evento, assim como reduziu a secreção de citocinas pró-inflamatórias e a deposição de colágeno, representando uma ferramenta promissora na detecção de possíveis alvos terapêuticos relacionados a esses processos.

Palavras-chave: Lectina tipo-C, *Bothrops pauloensis*, angiogênese, inflamação.

Abstract: The present work reports the effects of a C-type lectin (BpLec) isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom upon *in vitro* and *in vivo* angiogenesis models. Initially, we noted that BpLec was not cytotoxic to endothelial cells (tEnd) in doses up to 40 µg/mL, but lower doses (2.5 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL and 20 µg/mL) reduced tEnd cells adhesion to some extracellular matrix proteins and inhibited the *in vitro* vessel formation in Matrigel assay stimulated by bFGF. β-galactosides (D-lactose, N-acetyl-D-galactosamine and D-galactose) at 400 mM reversed the effect of BpLec on t End cells adhesion, whereas D-galactose (400 mM) partially reversed BpLec property of inhibiting vessel formation by tEnd cells in Matrigel. *In vivo* assays showed that BpLec increased hemoglobin content and capillary vessels number in polyether-polyurethane sponge discs subcutaneously implanted into dorsal skin mice. Additionally, BpLec also reduced collagen deposition and decreased the production of some inflammatory cytokines, such as IL-6, TNF-α and Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1), whereas myeloperoxidase (MPO) and N-acetylglucosaminidase (NAG) activities were not altered by BpLec. Taken together, our results indicate that BpLec might represent an interesting angiogenesis and inflammatory modulator that also could be used for searching possible therapeutic targets involved in these processes.

Key-words: C-type lectin, *Bothrops pauloensis*, angiogenesis, inflammation.

1. Introdução

Angiogênese consiste na formação de novos vasos capilares a partir de uma vasculatura pré-existente, geralmente suprindo nutrientes vitais e oxigênio a locais distantes do organismo e, conseqüentemente, participando de vários processos fisiológicos e patológicos, como desenvolvimento embrionário, cicatrização, reparo tecidual, crescimento tumoral e metástase (EELLEN et al., 2015; MARÇOLA E RODRIGUES, 2015; CHÁVEZ et al., 2016). Para que a angiogênese ocorra, há participação de importantes fatores de crescimento celular, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o fator de crescimento de fibroblastos, assim como de outros componentes que desencadeiam a sinalização celular, tais como receptores e proteínas integrais de membrana presentes nas células endoteliais (FOLKMAN et al., 1971; GOSPODAROWICZ, 1976; RAPRAEGER et al., 2013; GOVEIA et al., 2014; EELLEN et al., 2015).

A neovascularização é um passo importante para a progressão de várias doenças, como asma, fibrose do miocárdio, retinopatia, nefropatia diabética, psoríase, doenças inflamatórias, entre outras, mas principalmente o câncer (PANDYA et al., 2006; DELCOURT et al., 2015; KORNILUK et al., 2016; SU et al., 2016; WANNER et al., 2016). Por exemplo, para acelerar o processo de crescimento e inibir a apoptose, levando ao estabelecimento de uma metástase, as células tumorais beneficiam-se da formação de novos vasos no microambiente tumoral, podendo adquirir rapidamente os nutrientes necessários para proliferarem (D'AMORE, 1988; KIM et al., 2009; PEIN E OSKARSSON, 2015; KORNILUK et al., 2016). Dessa forma, intervenções terapêuticas que inibem a angiogênese podem ser bastante benéficas no tratamento de tais patologias, considerando-se inclusive que as estratégias empregadas atualmente apresentam eficácia bastante limitada (BERGERS E HANAHAN, 2008; GOVEIA et al., 2014).

Ainda mais, o entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na angiogênese é de grande interesse, de modo que várias metodologias têm sido empregadas para se avaliar a ação de compostos isolados de fontes naturais sobre a angiogênese (CHUNG et al., 2004; NANGIA-MARKER et al., 2000; CASSINI-VIEIRA et al., 2014; LIMA et al., 2014; CHÁVEZ et al., 2015;

ACHÊ et al., 2015). Dentre elas, destacam-se ensaios realizados *in vitro* que utilizam linhagens de células endoteliais e abordam sobretudo os efeitos de diferentes compostos sobre inibição da adesão, migração e proliferação celular, inibição da formação de vasos, entre outros (CHUNG et al., 2004; NANGIA-MARKER et al., 2000; MOMIC et al., 2012; ACHÊ et al., 2015). Nesse contexto, o Matrigel é um substrato sintético composto majoritariamente por proteínas da matriz extracelular, bastante utilizado tanto em ensaios acerca da angiogênese *in vitro* quanto *in vivo* que incluem formação de estruturas semelhantes a capilares e a complexas redes vasculares, além do implante subcutâneo de um *plug* de Matrigel, semelhante à uma matriz sintética, que permite a formação de vasos (KLEINMAN E MARTIN, 2005; ACHÊ et al., 2015).

A implantação de esponjas sintéticas no dorso de camundongos também tem sido uma metodologia bastante utilizada na avaliação da angiogênese inflamatória *in vivo*, visto que permite o estabelecimento de um processo fibroproliferativo, caracterizado por recrutamento de células inflamatórias, angiogênese e deposição de matriz extracelular (ANDRADE et al., 1987; BAILEY, 1988; ARAÚJO et al., 2010; 2011; CASSINI-VIEIRA et al., 2014; LIMA et al., 2014; ANDRADE E FERREIRA, 2016). Além disso, a presença de um constante estímulo, provocado pela injeção de algum composto no local de formação desse tecido, por exemplo, resulta em inflamação crônica, associada à ativação das cascatas de sinalização angiogênica (LIMA et al., 2014). Alguns trabalhos demonstram a ação de toxinas ofídicas recombinantes (desintegrinas) obtidas a partir da glândula da peçonha de jararacas por meio dessa metodologia, injetando-se diariamente baixas concentrações de tais toxinas em esponjas de poliéster poliuretano implantadas no dorso de camundongos (HIGUCHI et al., 2011; CASSINI-VIEIRA et al., 2014). Higuchi et al. (2011) mostraram que Leucurogin (*Bothrops leucurus*) reduziu a quantidade de hemoglobina intraimplante após o regime de tratamento com a toxina, ao passo que Cassini-Vieira et al. (2014) demonstraram que DisBa-01 (*Bothrops alternatus*) modula eventos-chave da angiogênese inflamatória, como a ativação e recrutamento de células inflamatórias, a neovascularização e deposição de matriz extracelular no tecido fibrovascular proliferativo presente nas esponjas sintéticas.

As lectinas tipo-C são um grupo de proteínas que também modulam a angiogênese (CHUNG et al., 2004; LEE et al., 2008; ARLIGHAUS et al., 2013; MOMIC et al., 2012; GRIFFIOEN E THIJSSSEN, 2014). Estas proteínas reconhecem carboidratos e são encontradas em uma variedade de fontes vegetais e animais, incluindo as peçonhas ofídicas, em que são designadas como Snaclecs (CLEMETSON et al., 2009; YAU et al., 2015). Visto que carboidratos participam de muitas interações moleculares, lectinas têm sido associadas a processos biológicos e aplicações farmacológicas, tais como proteção de plantas e invertebrados contra patógenos, indução e inibição da coagulação sanguínea, estimulação da resposta imune, adesão celular, citotoxicidade, terapia e diagnóstico tumorais, dentre outros (PEUMANS E VAN DAMME, 1995; KILPATRICK, 2002, ABREU et al., 2006; ELIFIO-ESPOSITO et al., 2011, YAU et al., 2015).

Estudos recentes envolvendo Snaclecs demonstram suas propriedades anti- e pró-angiogênicas, auxiliando conseqüentemente num melhor entendimento sobre os mecanismos envolvidos no progresso da angiogênese e também sobre características do microambiente tumoral, sugerindo importantes alvos relacionados nesses processos (CHUNG et al., 2004; PILORGET et al., 2007; WANG, 2008; MOMIC et al., 2012; CALDERON et al., 2014; DHANANJAYA E SIVASHANKARI, 2015). Algumas Snaclecs inibem a adesão, proliferação e migração de células endoteliais, assim como inibem a formação de vasos em Matrigel, constituindo promissoras ferramentas antiangiogênicas (PILORGET et al., 2007; MOMIC et al., 2012). Por outro lado, Agglucetin e Aggretin são Snaclecs que induzem angiogênese *in vitro* e *in vivo* e possuem como alvos integrinas e, por conseguinte, desencadeiam sinalização celular pela via FAK/fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/Akt e aumentam a expressão de VEGF (CHUNG et al., 2004; WANG, 2008).

BpLec é uma lectina tipo-C isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis* que atua sobre diferentes tipos celulares, sendo capaz de aglutinar eritrócitos de cão e gato e formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, além de reduzir a proliferação da bactéria *Staphylococcus aureus* (CASTANHEIRA et al., 2013). Recentemente, os efeitos de BpLec sobre formas taquizoítas de *Toxoplasma gondii* foram avaliados e mostraram que a toxina é capaz de diminuir

a adesão e proliferação do parasito em sua célula hospedeira (HeLa), em concentrações não-tóxicas tanto para o parasito quanto para as células HeLa (CASTANHEIRA et al., 2015). Considerando-se os promissores efeitos de Snaclecs relatados para diversos tipos celulares, incluindo células endoteliais (CHUNG et al., 2004; PILORGET et al., 2007; WANG, 2008; MOMIC et al., 2012; VAIYAPURI et al., 2012), o presente trabalho descreve os efeitos de BpLec, uma lectina tipo-C isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis* (CASTANHEIRA et al., 2013) sobre a angiogênese *in vitro* avaliada por ensaios de viabilidade, inibição da adesão celular e da formação de vasos em Matrigel. Também foram avaliados os efeitos de BpLec *in vivo* por implantação de esponjas sintéticas no dorso de camundongos, analisando-se as quantidades de hemoglobina, de vasos e de colágeno intraimplante, assim como alguns fatores inflamatórios, como quantificação de atividade enzimática e dosagem de citonas.

2. Material e métodos

2.1. Animais

Camundongos machos Balb/c com 7-8 semanas (20-30 g de massa corporal) foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CBEA/UFU) e mantidos em condições padrões de temperatura (25°C), umidade relativa do ar (60-65%, ciclo claro-escuro de 12 horas, ração e água *ad libitum*. Todos os procedimentos animais foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal local (CEUA, número de protocolo 051/13).

2.2. Isolamento de BpLec

BpLec foi isolada de acordo com Castanheira et al. (2013), conforme descrito no item 2.2.1. (Capítulo 2). Resumidamente, a peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* (50 mg) foi submetida a uma cromatografia de afinidade em resina de agarose imobilizada com D-galactose (0,5 x 4 cm, Pierce, EUA), equilibrada e inicialmente eluída com tampão CTBS (NaCl 150 mM, Tris 20 mM, CaCl₂ 5 mM, pH 7,4), seguida da adição de D-galactose 400 mM para a eluição de BpLec. O carboidrato presente na amostra foi removido por cromatografia de

exclusão molecular em gel Sephadex G-25 (1,5 cm x 2,5 cm) no cromatógrafo Äkta Prime Plus (GE HealthCare, Suécia), sendo a eluição proteica realizada em bicarbonato de amônio 100 mM pH 7,8, a um fluxo de 0,5 mL/min, coletando-se 500 µL/tubo a 280 nm.

O grau de homogeneidade de BpLec foi avaliado inicialmente por cromatografia em fase reversa utilizando-se a coluna C18 (2,0 × 2,5 cm, GE Health Care, Suécia), equilibrada com solvente A (ácido trifluoroacético 0,1% e acetonitrila 5%) e eluída com solvente B (acetonitrila 80% e ácido trifluoroacético 0,1%) de 0 a 100%, num fluxo de 0,5 mL/min a temperatura ambiente. Posteriormente, BpLec (10 µg) foi submetida a eletroforese em SDS- PAGE a 12,5%, sendo solubilizada em 10 µL de tampão de amostra [Tris HCl 50 mM pH 6,8, dodecil sulfato de sódio 2% (m/v; SDS), azul de bromofenol 1% (m/v) e glicerol 10% (v/v)] e aquecida a 100°C durante 10 minutos, na presença de 10 µL de β-mercaptoetanol 5% (v/v), e então corrida em tampão Tris-glicina 250 mM pH 8,3 durante aproximadamente 45 minutos a 10 mA e 300 V. Para análise das bandas proteicas, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 0,2% (v/v) (Sigma). Os marcadores de massa molecular utilizados foram: albumina de soro de bovino (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (36 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), tripsinogênio (24 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa) e α-lactalbumina (14,2 kDa) (Amersham Bioscience).

2.3. Avaliação dos efeitos de BpLec sobre células endoteliais *in vitro*

2.3.1. Cultura celular

Células do endotélio tímico murino (tEnd), gentilmente doadas pela Dra. Patrícia Bianca Clissa do Instituto Butantan (São Paulo, Brasil), foram mantidas em garrafas de 75 cm² contendo meio RPMI-1640 (GIBCO, Paisley, Inglaterra), suplementado com L- glutamina 2 mM, piruvato de sódio 2 mM, aminoácidos não-essenciais 1 mM, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) e soro fetal bovino inativado 10% (Cultilab, Campinas, Brasil), em uma incubadora umidificada a 37 °C e 5% de CO₂ (BUSSOLINO et al., 1991). Para o plaqueamento de células nos ensaios

subsequentes, o meio foi descartado das garrafas e 1 mL de tripsina foi adicionado à garrafa para promover o descolamento das células, que foram então centrifugadas e contadas por um microscópio óptico.

2.3.2. Viabilidade celular

Os efeitos de BpLec sobre a viabilidade celular de tEnd foram avaliados pela oxidação mitocondrial do reagente MTT [do inglês, *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* (Sigma) (MTT)], de acordo com Mosmann (1983), com algumas modificações. Células tEnd (5×10^4 células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços na presença de 100 μ L de meio RPMI e, no dia seguinte, o meio foi trocado e BpLec (80 μ g/mL-0,625 μ g/mL) foi incubada por diluição dupla seriada com as células. Tratamento das células com meio RPMI, na ausência de BpLec, foi utilizado como controle. Após 24 horas de incubação em estufa de CO₂, o reagente MTT (20 μ L; 5 mg/mL) foi adicionado a cada poço e a placa foi mantida na estufa por mais três horas. Em seguida, os cristais de formazan foram solubilizados com 100 μ L de PBS contendo SDS 10% (m/v) e HCl 10 mM. No outro dia, a absorbância foi mensurada a 570 nm. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem, considerando como 100% de crescimento celular a absorbância de células cultivadas em meio RPMI. O ensaio foi realizado em triplicata.

2.3.3. Inibição de adesão a substratos da matriz extracelular

O ensaio foi realizado de acordo com Achê et al. (2015), com algumas modificações. Inicialmente, para se avaliar os efeitos de BpLec sobre a inibição da adesão celular, células tEnd (5×10^4 células/poço) foram incubadas com diferentes concentrações de BpLec (dissolvida em meio RPMI) ou somente meio RPMI (controle) durante 30 minutos a 37°C. As células foram então semeadas em placas de 96 poços, que foram previamente incubadas com colágeno tipo IV (10 μ g/mL), fibronectina (5 μ g/mL) ou Matrigel (1 mg/mL; Sigma), e incubados em estufa de CO₂ por duas horas. Um controle sem nenhum substrato incubado às placas também foi realizado. Posteriormente, o meio foi retirado e os poços

lavados três vezes com 100 µL de PBS, para a remoção de células não aderidas. Em seguida, meio RPMI (100 µL) e 20 µL de MTT (5 mg/mL) foram acrescentados a cada poço e incubados por três horas em estufa de CO₂. Por fim, 100 µL de PBS contendo SDS 10% (m/v) e HCl 10 mM foram adicionados a cada poço e a leitura da absorbância foi feita a 570 nm no dia seguinte. Células cultivadas apenas em meio RPMI foram consideradas como controle de 100% de adesão celular. O ensaio foi realizado em triplicata, em três experimentos independentes.

Posteriormente, para se avaliar a inibição da atividade biológica de BpLec por carboidratos, BpLec (10 µg/mL) foi incubada com diferentes carboidratos (D-lactose, N-acetil-D-galactosamina, D-galactose e D-maltose; todos a 400 mM) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram incubadas com as células tEnd em placas de 96 poços (conforme descrito acima) sem a incubação de nenhum substrato da matriz extracelular. As células também foram incubadas apenas com os carboidratos e com meio RPMI (controles), que foi considerado como 100% de adesão celular. O ensaio foi realizado em triplicata, em três experimentos independentes.

2.3.4. Inibição da formação de vasos em Matrigel

O ensaio foi realizado de acordo com Yeh et al. (2001), com algumas modificações. Em suma, uma placa de 24 poços foi coberta com 50 µL de Matrigel e, em seguida, células tEnd ($0,3 \times 10^4$ células/poço) previamente incubadas com meio RPMI ou BpLec (10 µg/mL) durante 30 minutos a 37°C foram adicionadas a cada poço. Um controle de BpLec (10 µg/mL) previamente incubada com galactose 400 mM (30 minutos a temperatura ambiente; de acordo com CASTANHEIRA et al., 2013) também foi utilizado, para averiguar a inibição da atividade biológica da toxina pelo açúcar. A placa foi mantida em estufa de CO₂ por até 18 horas, quando as imagens foram analisadas em microscópio de contraste de fase e capturadas sob ampliação de 10 vezes. Para a quantificação dos vasos totais, cada poço foi dividido em 12 quadrantes e o número total de vasos formados foram somados. O ensaio foi realizado como três experimentos independentes em duplicata.

2.4. Avaliação dos efeitos de BpLec sobre angiogênese e inflamação *in vivo*

2.4.1. Implantação das esponjas

Esse procedimento foi realizado conforme descrito por Araújo et al. (2010). Brevemente, discos de esponjas sintéticas (poliéster poliuretano) de oito mm de diâmetro e quatro mm de espessura foram mantidos em álcool 70% (v/v) até 24 horas anteriores à implantação e, subsequencialmente, fervidos em água destilada por 30 minutos. Oito camundongos machos Balb/c, para cada grupo, foram previamente anestesiados por injeção intraperitoneal de uma solução contendo xilazina/cetamina (8 mg/kg e 60 mg/kg, respectivamente), e submetidos à assepsia da região dorsal com álcool 70% (v/v). O procedimento cirúrgico consistiu na realização de uma incisão mediana dorsal de aproximadamente um cm em direção caudal para a introdução da esponja, posicionada a aproximadamente 0,5 cm da região interescapular. A sutura da incisão foi feita com fio de nylon 3,0 usando ponto Donati. Após a recuperação da anestesia, os animais foram mantidos em gaiolas individuais com água e ração “ad libitum”.

BpLec (10 ng, 100 ng ou 1000 ng dissolvidos em 10 µL de PBS) foi injetada intrainplante durante oito dias consecutivos. Ao final do tratamento, as esponjas foram removidas cirurgicamente para realização das análises bioquímicas e histológicas e os animais imediatamente sacrificados. Todos os procedimentos referentes à manipulação, processamento e análise das esponjas foram realizados no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

2.4.2. Análise bioquímica dos implantes

2.4.2.1. Quantificação de hemoglobina

A quantificação do conteúdo de hemoglobina intrainplante foi feita utilizando-se o método do reagente de Drabkin (PLUNKETT E HAILEY, 1990). Cada implante foi homogeneizado em 2 mL de reagente de Drabkin (Labtest, São Paulo, Brasil) e centrifugado a 4°C e 12000 g por 40 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados em membranas de 0,22 µm e a concentração de hemoglobina determinada espectrofotometricamente a 540 nm em leitora de placas, comparando-se com uma curva padrão contendo concentrações conhecidas de

hemoglobina. A quantidade de hemoglobina (Hb) foi expressa em µg de Hb por mg de peso úmido de implante.

2.4.2.2 Quantificação de colágeno solúvel

A quantidade total de colágeno solúvel foi estimada de acordo com o método colorimétrico desenvolvido por Phillips et al. (2002), adaptado por Campos et al. (2006) para o modelo de implantes de esponja, baseando-se na reação do *Picrosirius Red*. Resumidamente, os implantes foram homogeneizados em salina 0,9% (m/v) contendo Triton X-100 0,1 % (v/v) e 50 µL dessa amostra foram misturados com 50 µL de reagente *Picrosirius Red*. Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 10000 g por 15 minutos, para a separação do complexo colágeno-*picrosirius red*, seguido por lavagem em 500 µL de etanol. O complexo foi então reconstituído em 1 mL de NaOH 500 mM e a leitura da absorbância realizada a 540 nm em uma leitora de microplacas. A quantidade total de colágeno foi determinada por meio de comparação com uma curva contendo concentrações conhecidas de colágeno (Merck) e os resultados expressos em quantidade de colágeno (µg) por mg de implante.

2.4.2.3. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A atividade da mieloperoxidase foi determinada após a coleta de sobrenadantes provenientes do ensaio de quantificação de hemoglobina (item 2.4.2.), conforme metodologia de Ferreira et al. (2007), com algumas modificações. Brevemente, o precipitado foi homogeneizado em 2 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 5,4 e as amostras (300 µL) foram misturadas com 600 µL de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB, Sigma) 0,5% (m/v) diluído em tampão fosfato pH 5,4. As amostras foram congeladas para posterior análise. Assim que descongeladas, as amostras foram centrifugadas a 10000 g por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes utilizados no ensaio enzimático. Assim, os sobrenadantes (200 µL) foram misturados com 100 µL de peróxido de hidrogênio 0,003% (v/v) e 100 µL de TMB 6,4 mM (3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina, Sigma) diluído em DMSO (dimetil sulfóxido; Merck). A solução reagiu por um minuto e foi interrompida pela adição de 100 µL de H₂SO₄ 4 M (Merck). A leitura da

absorbância foi realizada a 450 nm em uma leitora de microplacas e os resultados foram expressos em índice de MPO (absorbância em densidade óptica/g de peso úmido do implante).

2.4.2.4. Determinação da atividade da N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG)

A atividade enzimática de N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG) foi avaliada segundo Ferreira et al. (2007), com algumas modificações. Nesse ensaio, outra parte do precipitado proveniente da quantificação de hemoglobina (item 2.4.2.) foi homogeneizado em 2 mL de NaCl 0,9% (m/v) contendo Triton X-100 0,1 % (v/v) gelado e, posteriormente, centrifugado a 3000 g por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram incubados durante 30 minutos a 37°C com 100 µL do substrato p-nitrofenil-N-acetil-D-glicosamina (Sigma) dissolvido em tampão citrato-fosfato pH 4,5 (ácido cítrico 100 mM; Na₂HPO₄ 100 mM), sendo a reação pausada pela adição de 100 µL de tampão glicina 200 mM pH 10,6. A hidrólise do substrato foi acompanhada pela leitura da absorbância a 400 nm, comparando-se a uma curva padrão de p-nitrofenol (0-500 nmol/mL), que é produto cromógeno da reação entre p-nitrofenol-N-acetil-D-glicosamina com a N-acetil-D-glicosaminidase (NAG).

2.4.2.5. Dosagem de citocinas

Sobrenadantes provenientes do processamento das esponjas no ensaio de quantificação de hemoglobina (item 2.4.2.) foram agrupados e mantidos a -80°C para a quantificação de citocinas pelo método CBA (do inglês, *Cytometric Bead Array*), utilizando-se o Kit *CBA Mouse Inflammation* (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). A reação foi preparada utilizando-se 20 µL de sobrenadante, 20 µL de *beads* contendo cada citocina e 18 µL de FITC. Os limites de detecção foram 5.098 pg/mL para Interleucina-6 (IL-6); 5.043 pg/mL para Interleucina-10 (IL-10); 5.339 pg/mL para proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1); 5.062 pg/mL para Interferon-γ (IFN- γ); 5.054 pg/mL para fator de necrose tumoral-α (TNF-α); 5.122 pg/mL para Interleucina-12p70 (IL-12p70). As amostras foram analisadas por citometria de fluxo no BD Accuri C6 Flow Cytometer (BD Biosciences, CA, EUA) e os dados foram calculados pelo software FCAP ArrayTM versão 3.0 (BD

Biosciences, San Diego, CA, EUA), a partir de uma curva contendo concentrações conhecidas de cada citocina.

2.4.3. Análise histológica dos implantes

Para a análise histológica das esponjas, um novo experimento de implantação de esponjas foi realizado com o mesmo regime de tratamento com BpLec (10, 100 ou 1000 ng) ou PBS (controle), utilizando-se grupos de seis camundongos machos BALB/c (20-30 g de massa corporal). Resumidamente, as esponjas foram fixadas em solução Methacarn (metanol 60% v/v, clorofórmio 30% v/v; ácido acético 10% v/v) na geladeira durante três horas. Os implantes foram submetidos então a etapas de desidratação, diafanização, banho e inclusão em parafina, seguidos de cortes em micrótomo (secções de 5 µm). Posteriormente, as lâminas foram coradas de diferentes formas, de acordo com a análise desejada. Assim, para quantificação de vasos, os cortes foram corados com hematoxilina-eosina e analisados em microscópio óptico (LEICA ICC50). As fotos foram todas tiradas da periferia do implante, sendo feita a contagem visual dos vasos sanguíneos por fotos e, em seguida, somado a quantidade total de vasos presentes em todas as fotos de uma lâmina. A quantidade de fotos tiradas sempre tentou abranger toda a periferia do implante, sendo que no mínimo foram retiradas 15 fotos por cada lâmina. Para quantificação da deposição de colágeno tipo I e III, os cortes foram corados com *Picrosirius red* e posteriormente as lâminas foram colocadas sob um filtro de polarização, sendo analisadas no microscópio Nikon TS 100. A obtenção das imagens foi realizada seguindo o mesmo procedimento descrito acima e posteriormente estas foram analisadas no software Image J, considerando-se que as fibras tipo I se apresentam como fibras grossas, altamente birrefringentes e na cor vermelha, enquanto que as fibras tipo III se apresentam em feixes finos, com fraca birrefringência e na cor amarelo-esverdeado.

2.5. Análises estatísticas

Dados foram avaliados como média \pm desvio padrão de cada experimento, considerando-se $p < 0,05$ como estatisticamente significantes. Diferenças entre os

controles dos ensaios *in vitro* e cada tratamento foram analisados por ANOVA com comparações múltiplas por Bonferroni, utilizando-se GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Para os ensaios com as esponjas, a comparação entre os dois grupos foi feita utilizando-se o teste t de Student e, quando os dados consistiram de mais de dois grupos, foi feita a análise de variância (ANOVA), seguido do pós-teste de Newman-keuls. Os resultados foram considerados significativos para $p < 0,05$.

3. Resultados e discussão

3.1. Avaliação dos efeitos de BpLec sobre angiogênese *in vitro*

BpLec não mostrou citotoxicidade para células tEnd *in vitro*, exceto na maior concentração testada (80 $\mu\text{g/mL}$) (Fig. 1A). Concentrações não citotóxicas de BpLec inibiram a adesão dessas células a proteínas da matriz extracelular (ECM) (colágeno IV, fibronectina e Matrigel) (Fig. 1B). Surpreendentemente, concentrações baixas também apresentaram uma inibição em torno de 20% para as várias condições testadas. Com relação aos substratos previamente adicionados às placas, BpLec mostrou uma maior inibição na presença de Matrigel, principalmente nas menores concentrações da toxina. Tal fato provavelmente deve-se à variada composição do Matrigel, que inclui proteases, fatores de crescimento, mas principalmente diversas proteínas da ECM, como laminina, colágeno tipo IV, perlecana e entactina, que caracterizam-se também pela alta taxa de glicosilação que apresentam (KLEINMAN E MARTIN, 2005). Um controle sem nenhuma proteína da ECM também foi realizado (Fig. 1B), evidenciando que BpLec também inibiu a adesão celular nessa condição, de modo que BpLec possivelmente reconhece alvos presentes na estrutura celular, quando não interage com nenhuma proteína da ECM.

BjcuL, uma lectina isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*, interage com Matrigel, fibronectina e vitronectina, sendo essa característica inibida por D-galactose (ELIFIO-ESPOSITO et al., 2007; 2011; DAMASIO et al., 2014). BjcuL também age diretamente nas células endoteliais (ELIFIO-ESPOSITO et al., 2007), enquanto Galectina-3 liga-se diretamente tanto a células endoteliais ou a proteínas da ECM por meio do domínio de reconhecimento ao carboidrato (CRD)

presente na estrutura dessa lectina, evidenciando os diversos alvos que lectinas apresentam na angiogênese, incluindo glicoconjugados (NANGIA-MARKKER et al., 2000). Estes relatos são também corroborados pelo fato de que carboidratos presentes nas membranas das células endoteliais são cruciais para estas células desempenharem seus papéis fisiológicos, como diferenciação e adesão celulares, interação célula-célula, resposta imune e regulação de vias de sinalização celular (SASAKI E TOYODA, 2013).

Uma vez que a adesão de células endoteliais ocorre por meio da interação de proteínas integrais de membrana celular com substratos da matriz extracelular, alguns trabalhos relatam que Snaclecs inibem a angiogênese tanto *in vitro* quanto *in vivo* por bloquear algumas integrinas presentes na membrana das células endoteliais (BUSTILLO et al., 2015). Por exemplo, Lebectin, uma lectina isolada da peçonha de *Macrovipera lebetina*, inibe a formação de vasos pelas células microvasculares cerebrais humanas endoteliais (HBMECs) em Matrigel por meio do bloqueio das funções das integrinas $\alpha 5\beta 1$ e αv (PILORGET et al., 2007). Outras Snaclecs apresentam propriedades antiangiogênicas por inibirem a integrina $\alpha 2\beta 1$ (MOMIC et al., 2012; VAIYAPURI et al., 2012; ARLINGHAUS et al., 2013). Nossos dados mostram que BpLec possivelmente interage tanto com algum glicoconjugado presente na membrana celular de tEnd, assim como também pode reconhecer proteínas da matriz extracelular. Contudo, a identificação de possíveis alvos em células tEnd ou proteínas da matriz extracelular reconhecidos por BpLec ainda precisa ser elucidada posteriormente.

Para verificar a inibição da atividade biológica da toxina, BpLec (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi incubada com uma alta concentração (400 mM) de diferentes carboidratos, analisando-se a inibição dos efeitos de BpLec sobre a adesão de células tEnd por esses carboidratos. D-lactose, N-D-acetil-D-galactosamina e D-galactose reverteram a propriedade de BpLec em inibir a adesão de células tEnd (Fig. 2). Quando BpLec foi incubada com maltose (400 mM), a porcentagem de células aderidas foi bastante semelhante ao controle utilizando-se apenas o tratamento com BpLec, sugerindo que esse açúcar não apresenta efeito inibitório sobre a atividade de BpLec e que essa inibição da toxina seria apenas provocada por β -galactosídeos (Fig. 2). Castanheira et al. (2015) mostraram que D-galactose (400 mM) é capaz de inibir os efeitos de BpLec em reduzir a adesão de formas

taquizoítas de *Toxoplasma gondii* a células hospedeira HeLa. Dessa forma, os resultados aqui obtidos também indicam que BpLec reconhece algum glicoconjugado presente na superfície das células endoteliais murinas tEnd. Entretanto, a identificação de possíveis alvos presentes na membrana de tEnd reconhecidos por BpLec ainda precisa ser determinada em estudos posteriores envolvendo, por exemplo, ensaios de proteômica.

No presente estudo, também foi avaliada a capacidade de BpLec em inibir a formação de vasos em Matrigel. O substrato Matrigel tem sido bastante utilizado em ensaios *in vitro*, sobretudo em modelos com células endoteliais, visto que permite a adesão celular e a consequente formação de vasos, numa estrutura semelhante aos capilares sanguíneos que são formados *in vivo*, após poucas horas de incubação (KUBOTA et al., 1988; KLEINMAN E MARTIN, 2005; ACHÊ et al., 2015). Dessa forma, é possível quantificar os vasos formados após o tratamento tanto por estimuladores de angiogênese quanto por inibidores *in vitro*, sendo essa uma metodologia bastante empregada na avaliação de efeitos de um determinado composto sobre a angiogênese, permitindo vislumbrar futuras aplicações relacionadas a uma possível inibição e/ou indução da angiogênese (KLEINMAN E MARTIN, 2005). O pré-tratamento de células tEnd com BpLec (10 µg/mL) também resultou na inibição da formação de vasos por esse tipo celular (Fig. 3B), após a incubação em Matrigel das células tratadas com BpLec, quando comparada com a célula mantidas apenas em RPMI (Fig. 3A). Esses resultados são apresentados tanto por imagens fotográficas dos vasos (Fig. 3A e B) quanto por quantificação dos vasos formados em cada poço (Fig. 3D). Esses efeitos mostram que BpLec bloqueia as propriedades de células tEnd *in vitro*, como adesão celular e capacidade de formação de vasos, sem alterar a viabilidade celular.

Considerando-se que a atividade biológica de lectinas tipo-C geralmente envolve o reconhecimento a carboidratos presentes na membrana de vários tipos celulares, BpLec foi incubada com uma alta concentração de D-galactose para se investigar o envolvimento da interação proteína-carboidrato nas atividades aqui descritas. Interessantemente, quando D-galactose (400 mM) foi adicionada à solução de BpLec, a inibição da formação de vasos por células tEnd induzida por BpLec foi parcialmente revertida (Fig. 3C e 3D). Ainda mais, o grupo referente a

BpLec incubada com D-galactose não apresentou diferença estatística tanto em relação ao controle RPMI quanto à BpLec sozinha, indicando uma possível inibição parcial de BpLec por D-galactose nessa atividade testada (Fig. 3D). Castanheira et al. (2013; 2015) demonstraram a inibição da atividade de BpLec sobre diferentes tipos celulares por D-galactose, indicando o envolvimento de uma região estrutural da proteína denominada domínio de reconhecimento ao carboidrato (CRD). Assim, as atividades até então descritas possivelmente estariam relacionadas com a interação proteína-carboidrato, em que BpLec provavelmente reconhece glicoconjugados presentes nas membranas das células testadas nesses trabalhos (CASTANHEIRA et al., 2013; 2015).

Estudos recentes mostram que a ação antitumoral de algumas lectinas também pode estar associada a regiões da proteína diferentes do CRD, representando um mecanismo adicional (VLADOIU et al., 2014). Essa característica foi descrita para as galectinas que, assim como BpLec, também são lectinas de origem animal ligantes de β -D-galactosídeos (KASAI E HIBARAYASHI, 1996; VLADOIU et al., 2014). Os autores destacam que a galectina é capaz de reconhecer carboidratos de diferentes tamanhos, aumentando bastante o espectro de possíveis ligantes que essas proteínas apresentam, mas também interagem com outros alvos diferentes de carboidratos, como proteínas, estabelecendo interações proteína-proteína (VLADOIU et al., 2014). Devido a esse amplo reconhecimento, galectinas também podem apresentar funções antagônicas, incluindo ações anti- e pró-tumorais (VLADOIU et al., 2014). Dessa forma, outras regiões estruturais de BpLec, que não envolvem seu CRD, também podem estar envolvidos em seu reconhecimento a tEnd, mas ensaios demonstrando a interação entre BpLec e seus alvos em tEnd são necessários para a identificação de estruturas específicas da toxina envolvidas nesse processo.

3.2. Avaliação dos efeitos de BpLec sobre angiogênese e inflamação *in vivo*

Em adição aos promissores efeitos de BpLec sobre células endoteliais, as propriedades de BpLec também foram avaliadas *in vivo* por meio de um modelo de implantação de esponjas sintéticas em camundongos, as quais induzem inflamação, permitindo a caracterização de componentes do tecido fibrovascular

(ARAÚJO et al., 2010; LIMA et al., 2014). Visto que este é o primeiro relato acerca dos efeitos de uma Snaclec sobre angiogênese e inflamação *in vivo* avaliada por essa metodologia, as concentrações de BpLec utilizadas nesse ensaio (10 ng, 100 ng e 1000 ng) foram escolhidas de acordo com as concentrações utilizadas no tratamento de esponjas por DisBa-01, uma toxina recombinante obtida da glândula de peçonha da jararaca *Bothrops alternatus* (CASSINI-VIEIRA et al., 2014), seguindo valores semelhantes àqueles utilizados também nos ensaios de angiogênese *in vitro* com BpLec nesse trabalho. Os animais não apresentaram alterações de comportamento tanto após o procedimento cirúrgico quanto após a administração de BpLec ou PBS intrainplante, assim como não foi evidenciada rejeição à esponja sintética em nenhum dos animais (dados não-mostrados). Sendo assim, após o regimento de tratamento de oito dias consecutivos, as esponjas sintéticas foram cirurgicamente removidas e processadas para análises bioquímicas e histológicas.

BpLec aumentou o conteúdo de hemoglobina intrainplante após a administração da toxina durante oito dias consecutivos nos implantes (Fig. 4A), o que sugere uma potencial ação pró-angiogênica de BpLec *in vivo*, relacionada a um possível aumento de vascularização induzido por BpLec nesse ensaio. Após a contagem de vasos pela análise histológica dos implantes, também verificou-se que BpLec levou a um aumento no número de vasos, apesar de que apenas a maior concentração testada (1000 ng) foi capaz de induzir um aumento estatisticamente significativo na quantidade de vasos formados intrainplante (Fig. 4B). Fotomicrografias obtidas após cortes histológicos (5µm, coloração Hematoxilina-Eosina) da matriz esponjosa dos implantes também evidenciaram um aumento do número de vasos sanguíneos pelo tratamento por BpLec (1000 ng), demonstrado por um maior conteúdo de hemácias presentes no interior dos vasos (Fig. 5D), quando comparados ao controle (Fig. 5A) e aos demais tratamentos com BpLec a 10 ng (Fig. 5B) e a 100 ng (Fig. 5C). Tais resultados mostram uma potencial ação pró-angiogênica de BpLec, sobretudo considerando-se a maior concentração testada. Chung et al. (2004) mostraram que Aggretin, uma lectina isolada da peçonha de *Calloselasma rhodostoma*, estimula angiogênese tanto *in vitro* quanto *in vivo* por interagir com a integrina $\alpha 2\beta 1$, levando a ativação das vias PI3K (fosfatidilinositol-3-quinase), Akt (ou proteína

quinase B), e ERK1/2 (quinases reguladas por sinais extracelulares de proteína 1 e 2), e pelo aumento da expressão de VEGF. Por sua vez, Agglucetin, isolada da peçonha de *Agkistrodon acutus*, foi considerada um fator de sobrevivência sobre as células endoteliais HUVEC (do inglês, células endoteliais da veia umbilical humana), promovendo adesão celular e angiogênese pela ativação da vias FAK (quinase de adesão focal)/PI3K/Akt após interagir com a integrina $\alpha\beta 3$ (WANG, 2008).

Nossos resultados *in vitro* demonstraram uma propriedade antiangiogênica de BpLec e uma possível ação proangiogênica *in vivo*, mostrando que esta lectina pode ser utilizada como uma interessante ferramenta na investigação da modulação de angiogênese, permitindo a identificação de alvos relacionados tanto com o estímulo quanto com a inibição da angiogênese. Essa dualidade funcional pode ser explicada porque BpLec possivelmente age diretamente sobre células tEnd ou sobre proteínas da ECM *in vitro*, inibindo as funções celulares. Por outro lado, muitos outros fatores podem estar envolvidos na angiogênese *in vivo*, de modo que inúmeros alvos estariam sujeitos a um potencial reconhecimento por BpLec, o que poderia, conseqüentemente, acarretar na indução de angiogênese. Apesar de terem sido utilizadas concentrações semelhantes de BpLec em ambas abordagens, o tempo de tratamento utilizado em cada metodologia foi distinto, o que pode resultar em diferentes efeitos. Por fim, a quantificação de hemoglobina é uma forma indireta de se avaliar a angiogênese, de forma que outros ensaios, como expressão de estimuladores de angiogênese tais como VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e FGF (fator de crescimento de fibroblastos), dentre outros, são necessários para confirmar se há um possível efeito pró-angiogênico de BpLec *in vivo*.

BpLec (1000 ng) também diminuiu a quantidade de colágeno solúvel depositado nos implantes (Fig. 6A), enquanto a quantificação de colágeno obtida das análises histológicas das esponjas sintéticas tratadas com BpLec revelaram que todas as concentrações de BpLec não obtiveram efeitos sobre a deposição de colágeno tipo I (Fig. 6B), mas reduziram a deposição de colágeno tipo III (Fig. 6C). As fotomicrografias dos cortes histológicos das esponjas, corados por *Picrosirius Red*, evidenciaram uma diminuição da deposição de colágeno por BpLec em todas as concentrações testadas (Fig. 7B, C e D), com uma

significativa redução de colágeno tipo III, quando comparadas com o controle (Fig. 7A). Visto que o colágeno é o principal constituinte da matriz extracelular, lectinas isoladas de peçonhas ofídicas atuam tanto como agonistas quanto como antagonistas de receptores de colágeno, alterando as funções celulares, como adesão a ECM (MORITA, 2004; ARLINGHAUS et al., 2013; JAKUBOWSKI et al., 2013).

A diminuição na deposição de colágeno é um evento bastante importante em muitos processos patológicos. Cassini-Vieira et al. (2014) avaliaram a ação de uma toxina recombinante (DisBa-01) obtida a partir da glândula de *Bothrops alternatus* sobre o modelo murino de esponjas sintéticas e mostraram que DisBa-01 também é capaz de reduzir a deposição de colágeno nas esponjas, sugerindo um potencial efeito terapêutico da toxina no controle de doenças fibroproliferativas. Carapuça et al. (2016) demonstraram que diminuição na deposição de colágeno é bastante benéfica na terapia adjuvante em pacientes com adenocarcinoma pancreático, sendo um efeito mediado por cascatas de sinalização de FGF que altera as funções das células endoteliais presentes no microambiente tumoral. Borza et al. (2012) mostraram que a regulação da produção de colágeno pela inibição da integrina $\alpha 2\beta 1$ leva a uma melhora em injúria glomerular. A inibição de $\alpha 2\beta 1$ tem sido demonstrada para várias Snaclecs (Chung et al. 2004; MOMIC et al., 2012; ARLINGHAUS et al., 2013; JAKUBOWSKI et al., 2013), sugerindo que essa integrina constitui um potencial alvo para BpLec, o que poderia desencadear a redução de colágeno aqui descrita. Assim, esses resultados abrem perspectivas para novos estudos que investiguem o mecanismo pelo qual BpLec diminui a deposição de colágeno no modelo de esponjas.

Para avaliar os efeitos de BpLec nos componentes inflamatórios do tecido fibrovascular induzido pelos implantes subcutâneos nos camundongos, marcadores inflamatórios foram mensurados a partir de sobrenadantes coletados das esponjas, por meio de atividade enzimática e detecção da expressão de citocinas. BpLec não apresentou efeitos sobre as atividades das enzimas mieloperoxidase (MPO) (Fig. 8A) e N-acetil-D-glicosaminidase (NAG) (Fig. 8B) que representam a atividade de neutrófilos e macrófagos/monócitos, respectivamente (ARAÚJO et al., 2010). Interessantemente, algumas Snaclecs

são capazes de induzir ativação de neutrófilos, assim como também interagem com carboidratos presentes nas membranas de macrófagos (ELIFIO-ESPOSITO et al., 2011; SARTIM et al., 2014; DIAS-NETIPANYI et al., 2016). Uma vez que BpLec não alterou a atividade das enzimas aqui testadas, BpLec possivelmente não atua sobre esses tipos celulares ou ainda as divergências refletem diferenças entre as metodologias testadas nos trabalhos citados.

Os sobrenadantes provenientes do processamento das esponjas também foram utilizados na mensuração da secreção de algumas citocinas. IL-10, IL-12p70 and IFN- γ estavam abaixo do limite de detecção e não puderam ser determinadas aqui (dados não mostrados). Por sua vez, BpLec foi capaz de diminuir consideravelmente a secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-6 (Fig. 9A) e TNF- α (Fig. 9B), assim como também reduziu a liberação de MCP-1 (Fig. 9C), uma outra citocina pró-inflamatória, na sua maior concentração. Apesar de não ter influenciado as atividades enzimáticas testadas acima, BpLec é capaz de reduzir a secreção de citocinas pelas células, possivelmente como consequência de um eventual reconhecimento por BpLec a alguns antígenos presentes nas membranas celulares. TNF- α , por exemplo, é conhecida por participar na regulação de genes relacionados à glicosilação, aumentando a expressão de glicoconjugados na superfície de células endoteliais (GARCÍA-VALLEJO et al., 2006; SASAKI E TOYODA, 2013).

Contrariamente aos nossos resultados, Galatrox (*Bothrops atrox*) e BjcuL (*Bothrops jararacussu*) estimulam um aumento na produção de IL-6 e TNF- α por macrófagos e células T, apresentando-se como lectinas pró-inflamatórias. Os autores relatam que, para BjcuL, o aumento na expressão dessas citocinas sinaliza para um aumento na inflamação e, conseqüentemente, desencadeia um recrutamento de neutrófilos (DIAS-NETIPANYI et al., 2016). Dessa forma, considerando-se que BpLec reduziu a liberação dessas citocinas, um aumento na população de neutrófilos seria inesperado, corroborando os resultados descritos acima. Ainda mais, as menores concentrações de BpLec não apresentaram efeitos sobre MCP-1, uma proteína quimioatrativa de monócitos, o que poderia justificar também os resultados de BpLec sobre NAG descritos aqui. De acordo com tais resultados, BpLec apresenta uma potencial modulatória sobre a secreção de citocinas inflamatórias *in vivo*.

A presença de citocinas pró-inflamatórias é bastante característica desse modelo de estudo em esponjas sintéticas, de modo que trabalhos descritos na literatura já demonstraram que compostos isolados de diversas fontes também apresentaram uma diminuição na secreção de tais citocinas (MENDES et al., 2009; ARAÚJO et al., 2011; DE MOURA et al., 2011). Visto que este é o primeiro relato de uma Snaclec utilizada no tratamento de angiogênese e inflamação em esponjas implantadas em camundongos, o mecanismo pelo qual BpLec reduz a secreção endógena de citocinas é bastante desafiador e incentiva investigações mais minuciosas em estudos posteriores. Além disso, uma resposta inflamatória exacerbada está associada a diversos processos patológicos que resultam em dano tecidual e lesões de órgãos, como na doença autoimune, artrite reumatoide e outras inflamações crônicas, por exemplo, que podem representar potenciais alvos para a aplicação de BpLec na atenuação desses efeitos (BUCKLEY et al., 2013; STRYDOM E RANKIN, 2013).

4. Conclusões

BpLec não apresentou citotoxicidade *in vitro*, mas foi capaz de bloquear adesão celular e a formação de vasos por células tEnd, um fato parcialmente inibido por D-galactose. Em contrapartida, BpLec levou a um aumento de hemoglobina e vasos *in vivo*, mas diminuiu a quantidade de colágeno depositado, assim como reduziu a secreção de citocinas pró-inflamatórias, mostrando-se como um agente promissor também na modulação da secreção de citocinas. Esses relatos evidenciam que BpLec pode ser utilizada como uma ferramenta interessante em investigações acerca da modulação da angiogênese, podendo auxiliar na busca de possíveis alvos envolvidos nesses processos tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem gentilmente ao apoio técnico do Instituto de Genética e Bioquímica (INGEB/UFU) e do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM/UFU) da Universidade Federal de Uberlândia. Também agradecemos ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

(CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

6. Referências bibliográficas

ABREU, P. A.; ALBUQUERQUE, M. G.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Structure-function inferences based on molecular modeling, sequence-based methods and biological data analysis of snake venom lectins. **Toxicon**. v. 48, nº 6, p. 690-701, 2006.

ACHÊ, D. C.; GOMES, M. S.; DE SOUZA, D. L.; SILVA, M. A.; BRANDEBURGO MI, YONEYAMA KA, RODRIGUES RS, BORGES MH, LOPES DS, RODRIGUES VDE M. Biochemical properties of a new PI SVMP from *Bothrops pauloensis*: inhibition of cell adhesion and angiogenesis. **Int J Biol Macromol**. v. 72, p. 445-53, 2015.

ANDRADE, S. P.; FAN, T. P. D.; LEWIS, G. P. Quantitative in-vivo studies on angiogenesis in a rat sponge model. **British Journal of Experimental Pathology**, vol. 68, n (6), pp. 755-766, 1987.

ANDRADE, S. P.; FERREIRA, M. A. The Sponge Implant Model of Angiogenesis. **Methods Mol Biol**. v. 1430, p. 333-43, 2016.

ARAÚJO, F. A.; ROCHA, M. A.; FERREIRA, M. A.; CAMPOS, P. P.; CAPETTINI, L. S.; LEMOS, V. S.; ANDRADE, S. P. Implant-induced intraperitoneal inflammatory angiogenesis is attenuated by fluvastatin. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. v. 38, nº 4, p. 262-8, 2011.

ARAÚJO, F. A.; ROCHA, M. A.; MENDES, J. B.; ANDRADE, S. P. Atorvastatin inhibits inflammatory angiogenesis in mice through down regulation of VEGF, TNF-alpha and TGF-beta1. **Biomed Pharmacother**. v. 64, nº 1, p. 29-34, 2010.

ARLINGHAUS, F. T.; MOMIC, T.; AMMAR, N. A.; SHAI, E.; SPECTRE, G.; VARON, D.; MARCINKIEWICZ, C.; HEIDE, H.; LAZAROVICI, P.; EBLE, J. A. Identification of $\alpha 2\beta 1$ integrin inhibitor VP-I with anti-platelet properties in the venom of *Vipera palaestinae*. **Toxicon**. v. 64, p. 96-105, 2013.

BAILEY, P. J. Sponge implants as models. **Methods Enzymol**. v. 162, p. 327-34, 1988.

BERGERS, G.; HANAHAN, D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. **Nat Rev Cancer**. v. 8, n° 8, p. 592-603, 2008.

BORZA, C. M.; SU, Y.; CHEN, X.; YU, L.; MONT, S.; CHETYRKIN, S.; VOZIYAN, P.; HUDSON, B. G.; BILLINGS, P. C.; JO, H.; BENNETT, J. S.; DEGRADO, W. F.; ECKES, B.; ZENT, R.; POZZI, A. Inhibition of integrin $\alpha 2\beta 1$ ameliorates glomerular injury. **J Am Soc Nephrol**. v. 23, n° 6, p. 1027-38, 2012.

BUSSOLINO, F.; DE ROSSI, M.; SICA, A.; COLOTTA, F.; WANG, J. M.; BOCCHIETTO, E.; PADURA, I. M.; BOSIA, A.; DEJANA, E.; MANTOVANI, A. Murine endothelioma cell lines transformed by polyoma middle T oncogene as target for and producers of cytokines. **J Immunol**. v. 147, n° 7, p. 2122-9, 1991.

BUCKLEY, C. D.; GILROY, D. W.; SERHAN, C. N.; STOCKINGER, B.; TAK, P. P. The resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol**. v. 13, n° 1, p. 59-66, 2013.

BUSTILLO, S.; GARCÍA-DENEGRI, M. E.; GAY, C.; VAN DE VELDE, A. C.; ACOSTA, O.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; LEIVA, L. Phospholipase A_2 enhances the endothelial cell detachment effect of a snake venom metalloproteinase in the absence of catalysis. **Chem Biol Interact**. v. 5, p. 240:30-6, 2015.

CALDERON, L. A.; SOBRINHO, J. C.; ZAQUEO, K. D.; DE MOURA, A. A.; GRABNER, A. N.; MAZZI, M. V.; MARCUSSI, S.; NOMIZO, A.; FERNANDES, C. F.; ZULIANI, J. P.; CARVALHO, B. M.; DA SILVA, S. L.; STÁBELI, R. G.;

SOARES, A. M. Antitumoral activity of snake venom proteins: new trends in cancer therapy. **Biomed Res Int.** v. 2014, p. 1-19, 2014.

CAMPOS, P. P.; ANDRADE, S. P.; MORO, L.; FERREIRA, M. A.; VASCONCELOS, A.C. Cellular proliferation, differentiation and apoptosis in polyetherpolyurethane sponge implant model in mice. **Histology and Histopathology**, vol. 21, n. 12, pp. 1263-1270, 2006.

CARAPUÇA, E. F.; GEMENETZIDIS, E.; FEIG, C.; BAPIRO, T. E.; WILLIAMS, M. D.; WILSON, A. S.; DELVECCHIO, F. R.; ARUMUGAM, P.; GROSE, R. P.; LEMOINE, N. R.; RICHARDS, F. M.; KOCHER, H. M. Anti-stromal treatment together with chemotherapy targets multiple signalling pathways in pancreatic adenocarcinoma. **J Pathol.** p. 1-11, 2016.

CASSINI-VIEIRA, P.; DECONTE, S. R.; TOMIOSSO, T. C.; CAMPOS, P. P.; MONTENEGRO, C. DE F.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; BARCELOS, L. S.; ANDRADE, S. P.; ARAÚJO, F. DE A. DisBa-01 inhibits angiogenesis, inflammation and fibrogenesis of sponge-induced-fibrovascular tissue in mice. **Toxicon.** v. 92, p. 81-9, 2014.

CASTANHEIRA, L.; NAVES DE SOUZA, D. L.; SILVA, R. J.; BARBOSA B, MINEO JR, TUDINI KA, RODRIGUES R, FERRO EV, DE MELO RODRIGUES V. Insights into anti-parasitism induced by a C-type lectin from *Bothrops pauloensis* venom on *Toxoplasma gondii*. **Int J Biol Macromol.** v. 74, p. 568-74, 2015.

CASTANHEIRA, L. E.; NUNES, D. C.; CARDOSO, T. M.; SANTOS, P.DE S.; GOULART, L. R.; RODRIGUES, R. S.; RICHARDSON, M.; BORGES, M. H.; YONEYAMA, K. A.; RODRIGUES, V. M.. Biochemical and functional characterization of a C-type lectin (BpLec) from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Int J Biol Macromol.** v. 54, p. 57-64, 2013.

CHÁVEZ, M. N.; AEDO, G.; FIERRO, F. A.; ALLENDE, M. L.; EGAÑA, J. T. Zebrafish as an Emerging Model Organism to Study Angiogenesis in Development and Regeneration. **Front Physiol.** v. 7, p. 1-15, 2016.

CHUNG, C. H.; WU, W. B.; HUANG, T. F. Aggretin, a snake venom-derived endothelial integrin alpha 2 beta 1 agonist, induces angiogenesis via expression of vascular endothelial growth factor. **Blood.** v. 103, nº 6, p. 2105-13, 2004.

CLEMETSON, K. J.; MORITA, T.; MANJUNATHA KINI, R. Scientific and standardization committee communications: classification and nomenclature of snake venom C-type lectins and related proteins. **J Thromb Haemost.** v. 7, p. 360, 2009.

DAMASIO, D. DE C.; NOLTE, S.; POLAK, L. P.; BRANDT, A. P.; BONAN, N. B.; ZISCHLER, L.; STUELP-CAMPELO, P. M.; CADENA, S. M.; NORONHA, L. D.; ELÍFIO-ESPOSITO, S. L.; MORENO-AMARAL, A. N. The lectin BJcuL induces apoptosis through TRAIL expression, caspase cascade activation and mitochondrial membrane permeability in a human colon adenocarcinoma cell line. **Toxicon.** v. 90, p. 299-307, 2014.

D'AMORE, P. A. Antiangiogenesis as a strategy for antimetastasis. **Semin Thromb Hemost.** v. 14, nº 1, p. 73-8, 1988.

DELCOURT, N.; QUEVEDO, C.; NONNE, C.; FONS, P.; O'BRIE, N. D.; LOYAUX, D.; DIEZ, M.; AUTELITANO, F.; GUILLEMOT, J. C.; FERRARA, P.; MURIANA, A.; CALLOL, C.; HÉRAULT, J. P.; HERBERT, J. M.; FAVRE, G.; BONO, F. Targeted identification of sialoglycoproteins in hypoxic endothelial cells and validation in zebrafish reveal roles for proteins in angiogenesis. **J Biol Chem.** v.;290, nº 6, p. 3405-17, 2015.

DE MOURA, S. A.; FERREIRA, M. A.; ANDRADE, S. P.; REIS, M. L.; NOVIELLO, M. DE L.; CARA, D. C. Brazilian green propolis inhibits inflammatory angiogenesis in a murine sponge model. **Evid Based Complement Alternat Med.** p. 1-7, 2011.

DHANANJAYA, B. L.; SIVASHANKARI, P. R. Snake venom derived molecules in tumor angiogenesis and its application in cancer therapy; an overview. **Curr Top Med Chem.** v. 15, nº 7, p. 649-57, 2015.

DIAS-NETIPANYI, M. F.; BOLDRINI-LEITE, L. M.; TRINDADE, E. S.; MORENO-AMARAL, A. N.; ELIFIO-ESPOSITO, S. Bjcül, A snake venom lectin, modulates monocyte-derived macrophages to a pro-inflammatory profile in vitro. **Toxicol In Vitro.** v. 2333, nº 16, p. 30037-6, 2016.

EELLEN, G.; DE ZEEUW, P.; SIMONS, M.; CARMELIET, P. Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature. **Circ Res.** v. 116, nº 7, p. 1231-44, 2015.

ELIFIO-ESPOSITO, S. L.; HESS, P. L.; MORENO, A. N.; LOPES-FERREIRA, M.; RICARAT, C. A. O.; SOUZA, M. V.; HASSELMAN-ZIELINSKI, F.; BECKER, J. A.; PEREIRA, L. F. A C-Type lectin from *Bothrops jararacussu* venom can adhere to extracellular matrix proteins and induce the rolling of leukocytes. **J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.** v. 13, n. 4, p.7'82-799, 2007.

ELIFIO-ESPOSITO, S.; TOMAZELI, L.; SCHWARTZ, C.; GIMENEZ, A. P.; FUGII, G. M.; FERNANDES, L. C.; ZISHLER, L. F.; STUELP-CAMPELO, P. M.; MORENO, A. N. Human neutrophil migration and activation by BJCüL, a galactose binding lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom. **BMC Immunol.** p. 1-7, 2011.

FERREIRA, M. A.; BARCELOS, L. S.; TEIXEIRA, M. M.; BAKHLE, Y. S.; ANDRADE, S. P. Tumor growth, angiogenesis and inflammation in mice lacking receptors for platelet activating factor (PAF). **Life Sci.** v. 81, nº 3, p. 210-7, 2007.

FOLKMAN, J.; MERLER, E.; ABERNATHY, C.; WILLIAMS, G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. **J Exp Med.** v. 133, nº 2, p. 275-88, 1971.

GARCÍA-VALLEJO, J. J.; VAN DIJK, W.; VAN HET HOF, B.; VAN DIE, I.; ENGELSE, M. A.; VAN HINSBERGH, V. W.; GRINGHUIS, S. I. Activation of human endothelial cells by tumor necrosis factor-alpha results in profound changes in the expression of glycosylation-related genes. **J Cell Physiol.** v. 206, nº 1, p. 203-10, 2006.

GOSPODAROWICZ, D. Humoral control of cell proliferation: the role of fibroblast growth factor in regeneration, angiogenesis, wound healing, and neoplastic growth. **Prog Clin Biol Res.** v. 9, p. 1-19, 1976.

GOVEIA, J.; STAPOR, P.; CARMELIET, P. Principles of targeting endothelial cell metabolism to treat angiogenesis and endothelial cell dysfunction in disease. **EMBO Mol Med.** v. 6, nº 9, p. 1105-20, 2014.

GRIFFIOEN, A. W.; THIJSSSEN, V. L. Galectins in tumor angiogenesis. **Ann Transl Med.** v. 2, nº 9, p. 90, 2014.

HIGUCHI, D. A.; ALMEIDA, M. C.; BARROS, C. C.; SANCHEZ, E. F.; PESQUERO, P. R.; LANG, E. A.; SAMAAAN, M.; ARAUJO, R. C.; PESQUERO, J. B.; PESQUERO, J. L. Leucurogin, a new recombinant disintegrin cloned from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) with potent activity upon platelet aggregation and tumor growth. **Toxicon.** v. 58, nº 1, p. 123-9, 2011.

JAKUBOWSKI, P.; CALVETE, J. J.; EBLE, J. A.; LAZAROVICI, P.; MARCINKIEWICZ, C. Identification of inhibitors of $\alpha 2\beta 1$ integrin, members of C-lectin type proteins, in *Echis sochureki* venom. **Toxicol Appl Pharmacol.** v. 269, nº 1, p. 34-42, 2013.

KASAI, K.; HIRABAYASHI, J. Galectins: a family of animal lectins that decipher glycocodes. **J Biochem.** v. 119, nº 1, p. 1-8, 1996.

KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochim Biophys Acta.** v. 1572, nº 2-3, p. 187-97, 2002.

KIM, M. P.; PARK, S. I.; KOPETZ, S.; GALLICK, G. E. Src family kinases as mediators of endothelial permeability: effects on inflammation and metastasis. **Cell Tissue Res.** v. 335, n° 1, p. 249-59, 2009.

KLEINMAN, H. K.; MARTIN, G. R. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. **Semin Cancer Biol.** v. 15, n° 5, p. 378-86, 2005.

KORNILUK, A.; KOPER, O.; KEMONA, H.; DYMICKA-PIEKARSKA, V. From inflammation to cancer. **Ir J Med Sci.** 2016.

KUBOTA, Y.; KLEINMAN, H. K.; MARTIN, G. R.; LAWLEY, T. J. Role of laminin and basement membrane in the differentiation of human endothelial cells into capillary-like structure. **J Cell Biol.** v. 107, p. 1589–98, 1988.

LAEMMLI, U. K.. Cleavage of structural proteins, during the annembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** v. 227, p. 680-289, 1970.

LEE, J. E.; MIRZA, S. P.; DIDIER, D. N.; SCALF, M.; OLIVIER, M.; GREENE, A. S.; SMITH, L. M. Identification of cell surface markers to differentiate rat endothelial and fibroblast cells using lectin arrays and LC-ESI-MS/MS. **Anal Chem.** v. 80, n° 21, p. 8269-75, 2008.

LIMA, L. D.; ANDRADE, S. P.; CAMPOS, P. P.; BARCELOS, L. S.; SORIANI, F. M.; MOURA, S. A.; FERREIRA, M. A. Brazilian green propolis modulates inflammation, angiogenesis and fibrogenesis in intraperitoneal implant in mice. **BMC Complement Altern Med.** v. 29, p. 14:177, 2014.

MARÇOLA, M.; RODRIGUES, C. E. Endodhelial progenitor cells in tumor angiogenesis: another brick in the wall. **Stem Cells Int.** p.1-10, 2015.

MENDES, J. B.; CAMPOS, P. P.; ROCHA, M. A.; ANDRADE, S. P. Cilostazol and pentoxifylline decrease angiogenesis, inflammation, and fibrosis in sponge-

induced intraperitoneal adhesion in mice. **Life Sci.** v. 84, n° 15-16, p. 537-43, 2009.

MOMIC, T.; COHEN, G.; REICH, R.; ARLINGHAUS, F. T.; EBLE, J. A.; MARCINKIEWICZ, C.; LAZAROVICI, P. Vixapatin (VP12), a c-type lectin-protein from *Vipera xantina palestinae* venom: characterization as a novel anti-angiogenic compound. **Toxins (Basel)**. v. 4, n° 10, p. 862-77, 2012.

MORITA, T. C-type lectin-related proteins from snake venoms. **Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord**. v. 4, n° 4, p. 357-73, 2004.

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

NANGIA-MAKKER, P.; HONJO, Y.; SARVIS, R.; AKAHANI, S.; HOGAN, V.; PIENTA, K. J.; RAZ, A. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. **Am J Pathol**. v. 156, n° 3, p. 899-909, 2000.

PANDYA, N. M.; DHALLA, N. S.; SANTANI, D. D. Angiogenesis—a new target for future therapy. **Vascul Pharmacol**. v. 44, n° 5, p. 265-74, 2006.

PEIN, M; OSKARSSON, T. Microenvironment in metastasis: roadblocks and supportive niches. **Am J Physiol Cell Physiol**. v. 309 (n° 10), p. 627-38, 2015.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol**. v. 109, n° 2, p. 347-52, 1995.

PHILLIPS, C. L.; PFEIFFER, B. J.; LUGER, A. M.; FRANKLIN, C. L. Novel collagen glomerulopathy in a homotrimeric type I collagen mouse (oim). **Kidney International**. v. 62, n° 2, p. 383-391, 2002.

PILORGET, A.; CONESA, M.; SARRAY, S.; MICHAUD-LEVESQUE, J.; DAOUD, S.; KIM, K. S.; DEMEULE, M.; MARVALDI, J.; EL AYEB, M.; MARRAKCHI, N.; BÉLIVEAU, R.; LUIS, J. Lebectin, a *Macrovipera lebetina* venom-derived C-type lectin, inhibits angiogenesis both in vitro and in vivo. **J Cell Physiol.** v. 211, n° 2, p. 307-15, 2007.

PLUNKETT, M. L.; HAILEY, J. A. An in vivo quantitative angiogenesis model using tumor cells entrapped in alginate. **Laboratory Investigation**, vol. 62, n. 4, pp. 510-517, 1990.

RAPRAEGER, A. C.; ELL, B. J.; ROY, M.; LI, X.; MORRISON, O. R.; THOMAS, G. M.; BEAUVAIS, D. M. Vascular endothelial-cadherin stimulates syndecan-1-coupled insulin-like growth factor-1 receptor and cross-talk between $\alpha\beta 3$ integrin and vascular endothelial growth factor receptor 2 at the onset of endothelial cell dissemination during angiogenesis. **FEBS J.** v. 280, n° 10, p. 2194-206., 2013

SARTIM, M. A.; RIUL, T. B.; DEL CISTIA-ANDRADE, C.; STOWELL, S. R.; ARTHUR, C. M.; SORGI, C. A.; FACCIOLI, L. H.; CUMMINGS, R. D.; DIAS-BARUFFI, M.; SAMPAIO, S. V. Galatrox is a C-type lectin in *Bothrops atrox* snake venom that selectively binds LacNAc-terminated glycans and can induce acute inflammation. **Glycobiology.** v. 24, n° 11, p. 1010-21, 2014.

SASAKI, N.; TOYODA, M. Glycoconjugates and related molecules in human vascular endothelial cells. **Int J Vasc Med.** v. 2013, p. 963596, 2013.

STRYDOM, N.; RANKIN, S. M. Regulation of circulating neutrophil numbers under homeostasis and in disease. **J Innate Immun.** v. 5, n° 4, p. 304-14, 2013.

SU, X; REN, Y.; YU, N.; KONG, L.; KANG, J. Thymoquinone inhibits inflammation, neoangiogenesis and vascular remodeling in asthma mice. **Int Immunopharmacol.** v. 38, p. 70-80, 2016.

VAIYAPURI, S.; HUTCHINSON, E. G.; ALI, M. S.; DANNOURA, A.; STANLEY, R. G.; HARRISON, R. A.; BICKNELL, A. B.; GIBBINS, J. M. Rhinocetin, a venom-derived integrin-specific antagonist inhibits collagen-induced platelet and endothelial cell functions. **J Biol Chem**. v. 287, n° 31, p. 26235-44, 2012.

VLADOIU, M. C.; LABRIE, M.; ST-PIERRE, Y. Intracellular galectins in cancer cells: potential new targets for therapy (Review). **Int J Oncol**. v. 44, n° 4, p. 1001-14, 2014.

WANG, W. J. Agglucetin, a tetrameric C-type lectin-like venom protein, regulates endothelial cell survival and promotes angiogenesis by activating integrin alphavbeta3 signaling. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 369, n° 2, p. 753-60, 2008.

WANNER, C.; AMANN, K.; SHOJI, T. The heart and vascular system in dialysis. **Lancet**. p. 1-10, 2016.

YAU, T.; DAN, X.; NG, C. C.; NG, T. B. Lectins with Potential for Anti-Cancer Therapy. **Molecules**. v. 20, n° 3, p. 3791-3810, 2015.

YEH, C. H.; PENG, H. C.; YANG, R. S.; HUANG, T. F. Rhodostomin, a snake venom disintegrin, inhibits angiogenesis elicited by basic fibroblast growth factor and suppresses tumor growth by a selective alpha(v)beta(3) blockade of endothelial cells. **Mol Pharmacol**. v. 59, n° 5, p. 1333-42, 2001.

Figuras

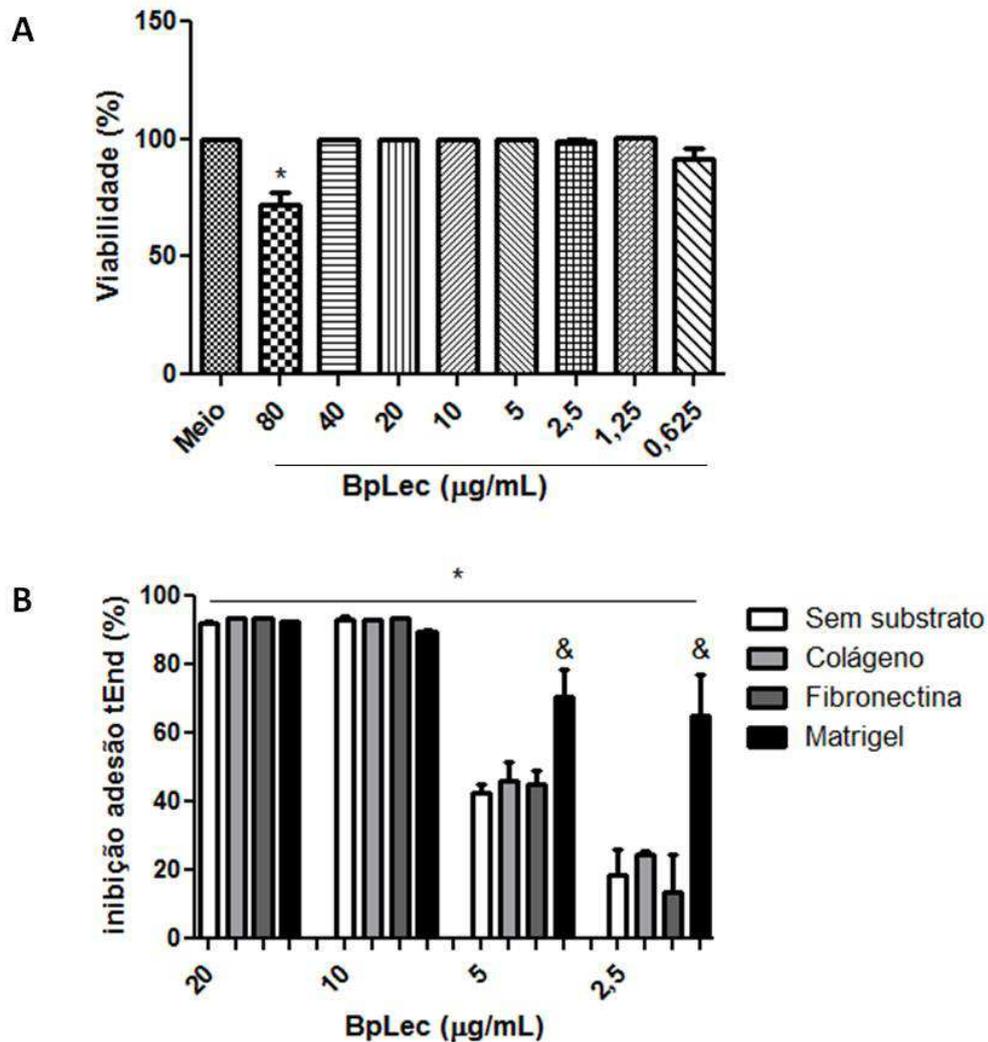


Figura 1: Efeitos de BpLec em células tEnd *in vitro*. Viabilidade celular foi testada pelo método do reagente MTT, sendo meio RPMI considerado como 100% de crescimento celular, após o tratamento das células durante 24 horas (A). Inibição da adesão celular a proteínas da matriz extracelular (ECM) após a incubação de células tEnd com meio RPMI (controle) ou diferentes concentrações de BpLec durante 30 minutos a 37°C (B). (*) representa diferenças estatísticas entre o controle RPMI e os tratamentos com BpLec; (&) representa diferenças estatísticas entre os substratos incubados com as mesmas concentrações de BpLec ($p < 0,005$; ANOVA).

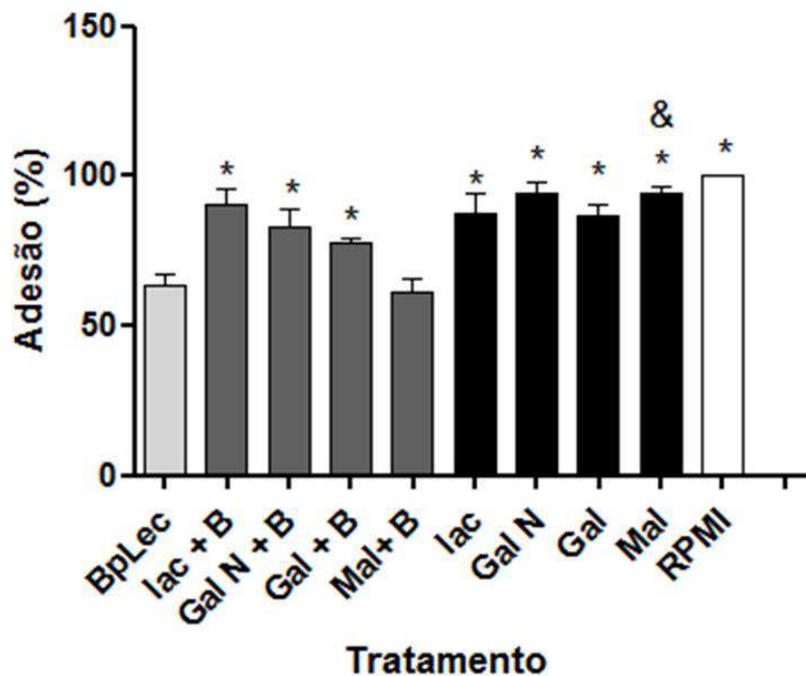


Figura 2: Inibição por carboidratos dos efeitos de BpLec sobre adesão de células tEnd. Inicialmente, BpLec (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi incubada com diferentes carboidratos (D-lactose, N-acetil-D-galactosamina, D-galactose e D-maltose; todos a 400 mM) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras contendo a lectina mais carboidrato foram incubadas com as células tEnd (5×10^4 células/poço) durante 30 minutos a 37°C. As células foram subsequencialmente plaqueadas e adesão celular foi determinada pelo método do reagente MTT, sendo o o cultivo celular em meio RPMI considerado como 100% de adesão. Lac: lactose (400 mM); Gal N: N-acetil-D-galactosamina (400 mM); Gal: galactose (400 mM); Mal (maltose 400 mM); B: BpLec (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (*) representa diferenças estatísticas entre o tratamento BpLec e os demais tratamentos; (&) representa diferenças estatísticas entre BpLec incubada com os carboidratos e o tratamento do carboidrato correspondente ($p < 0,005$; ANOVA).

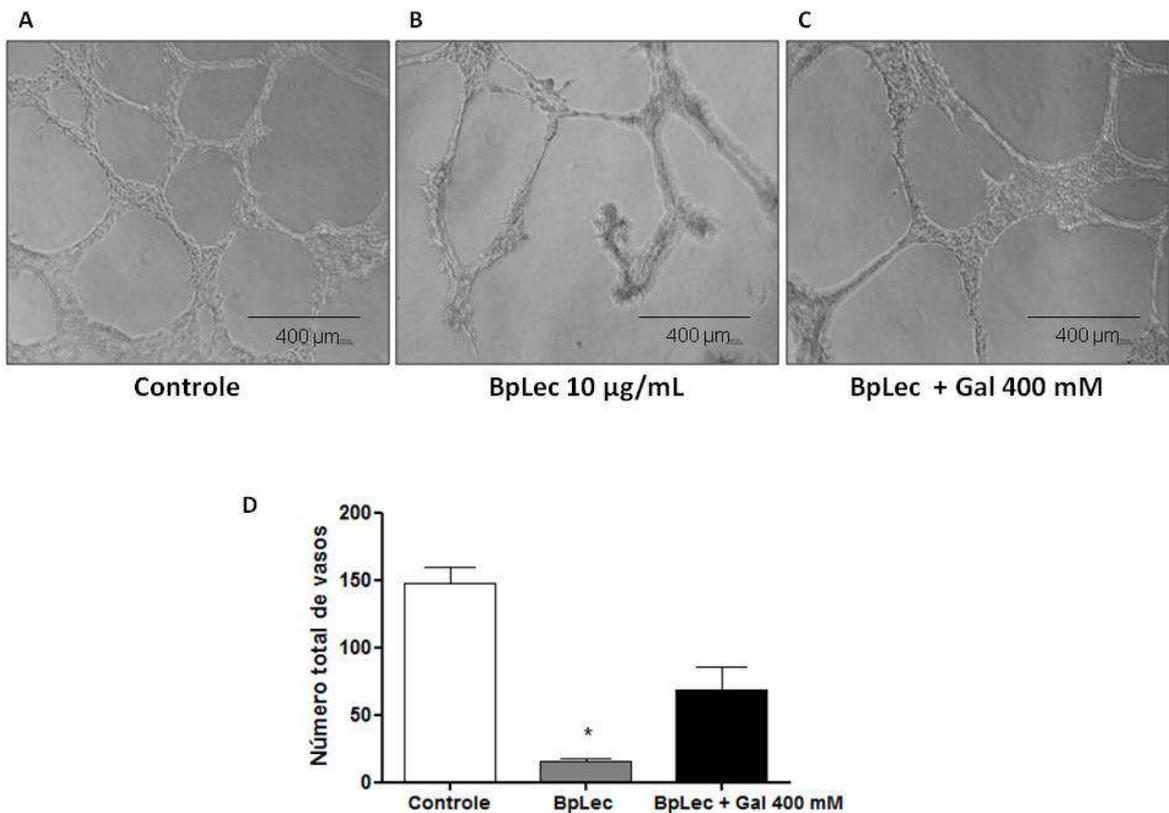


Figura 3: Inibição da formação de vasos em Matrigel. As células foram incubadas (30 minutos a 37°C) em meio RPMI (A) ou BpLec (10 µg/mL) (B) ou BpLec previamente incubada com D-galactose 400 mM (C). Em seguida, as células tratadas foram cultivadas em Matrigel (Sigma) em uma placa de 24 poços por até 18 horas em estufa de CO₂. As imagens foram analisadas por microscopia de contraste de fase sob ampliação de dez vezes na lente objetiva. O número total de vasos foi quantificado pela contagem total de vasos formados em cada poço (D). (*) representa diferenças estatísticas entre o controle RPMI e os tratamentos (p<0,005; ANOVA).

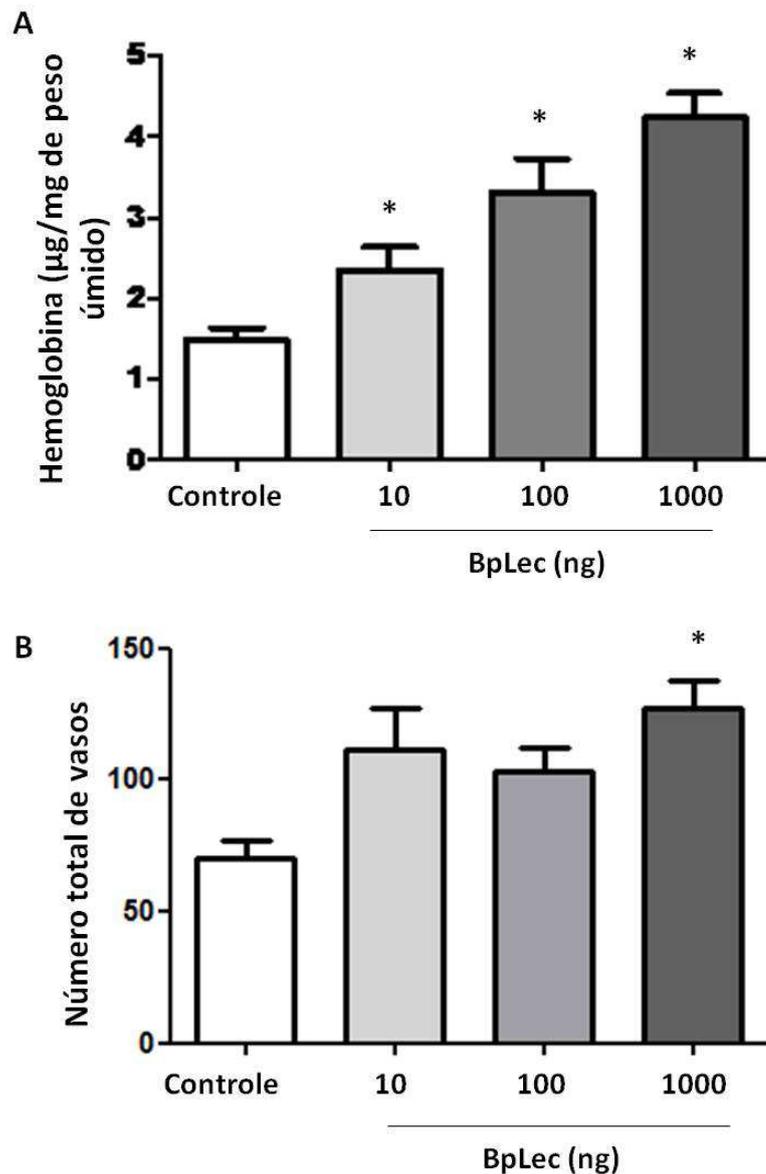


Figura 4: Influência de BpLec sobre angiogênese *in vivo*. Esponjas foram implantadas em camundongos Balb/c e tratadas durante oito dias consecutivos com controle (PBS) ou BpLec (10, 100 ou 1000 ng em 10 µL de PBS). Ao final do tratamento, as esponjas foram cirurgicamente removidas e a angiogênese foi avaliada indiretamente por quantificação de hemoglobina, pelo método de Drabkin (A) e também por análise histológica das esponjas, coradas por hematoxilina/eosina para a contagem do número de vasos presentes na área total do implante (B) (*) representa diferenças estatísticas entre o controle (PBS) e tratamentos com BpLec ($p < 0,005$; ANOVA).

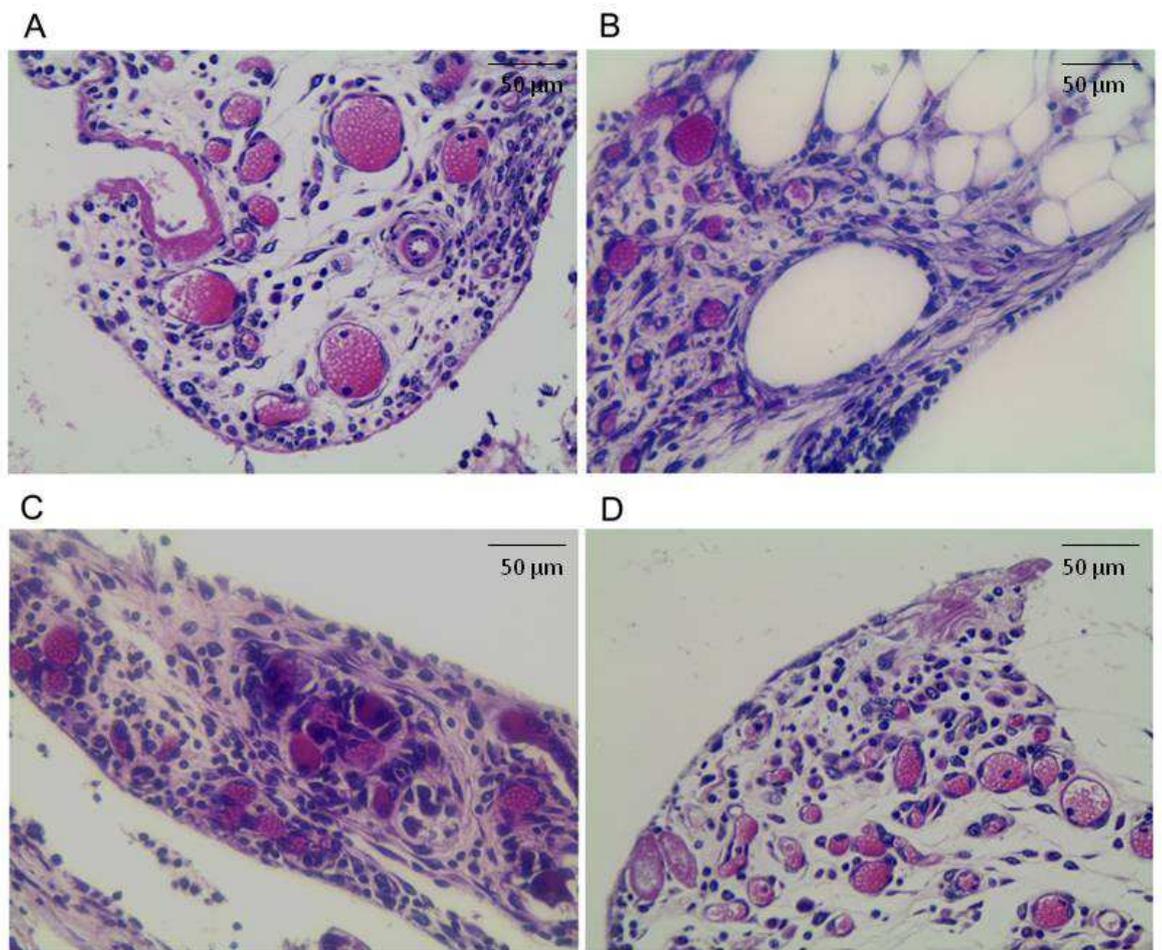


Figura 5: Fotomicrografia da matriz esponjosa dos implantes obtida após coloração dos cortes histológicos (5 µm) por Hematoxilina-Eosina sob aumento de 400 vezes (40X lente objetiva; 10X lente ocular). O número de vasos foi analisado após os tratamentos das esponjas com PBS (A); BpLec 10 ng (B); BpLec 100 ng (C) e BpLec 1000 ng (D).

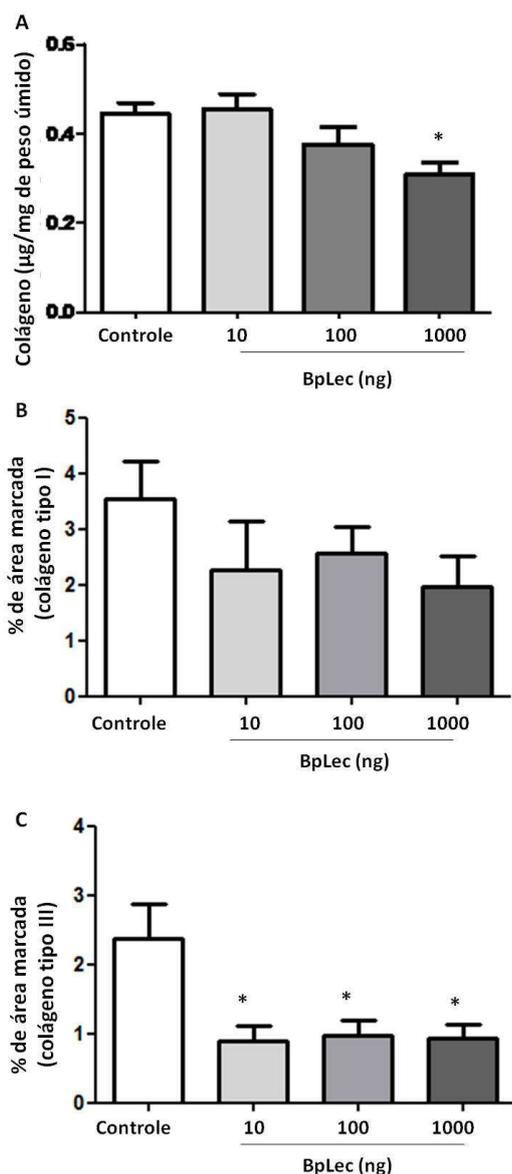


Figura 6: Alteração da deposição de colágeno intrainplante após o tratamento com BpLec. Após a remoção cirúrgica dos implantes nos animais, as esponjas sintéticas foram processadas para a análise bioquímica de deposição de colágeno, quantificado pelo método do reagente *Picrosirius Red* (A). Em um outro grupo de animais, as esponjas tratadas por BpLec ou PBS (controle) também foram retiradas e analisadas histologicamente com relação à deposição de colágeno I (B) e III (C) nos implantes, por meio de coloração por *Picrosirius Red*, sendo expressa como porcentagem (%) de área marcada. (*) representa diferenças estatísticas entre o controle (PBS) e tratamentos com BpLec ($p < 0,05$; ANOVA).

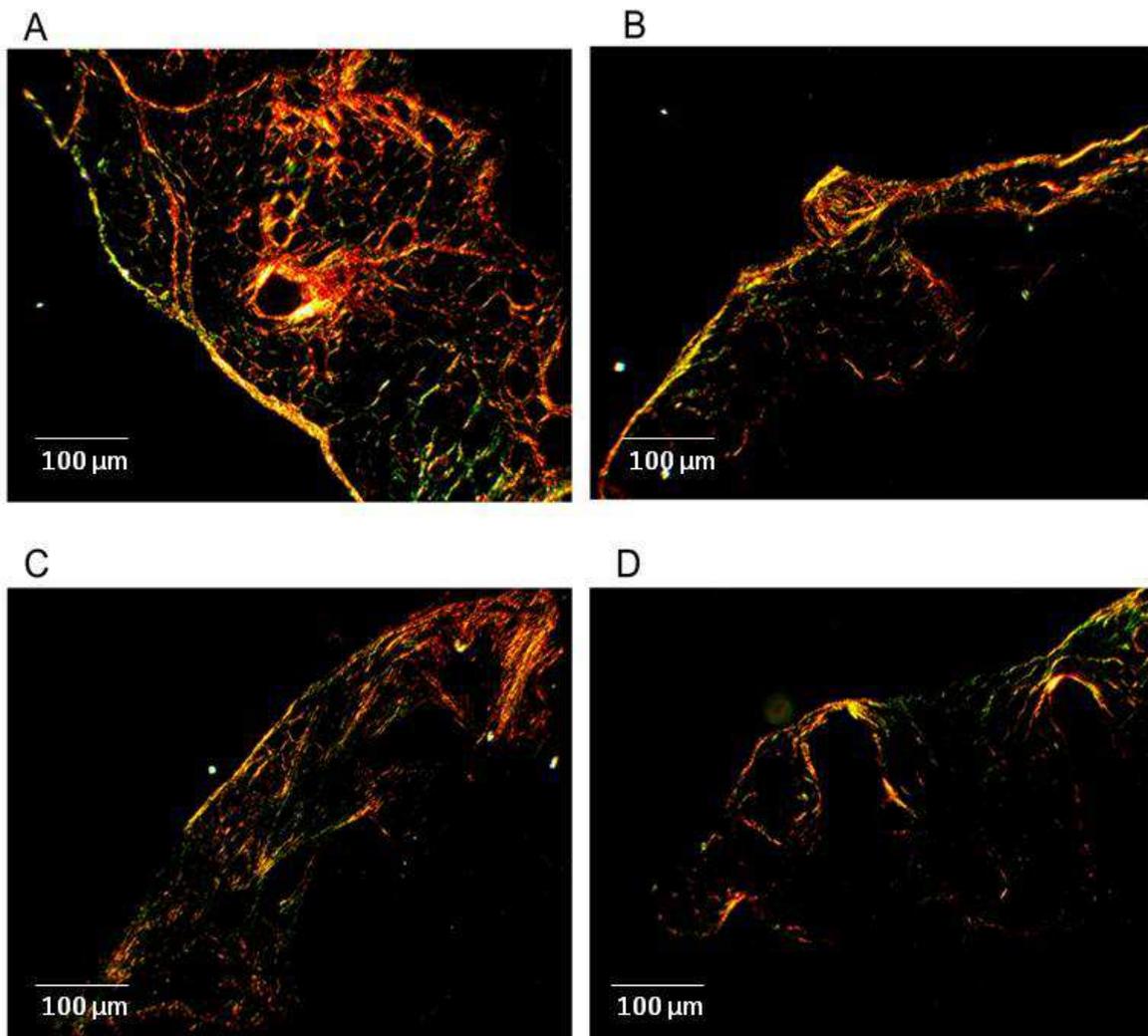


Figura 7: Fotomicrografia de implantes subcutâneos nos camundongos obtida por microscopia de polarização após coloração dos cortes histológicos (5 μm) por coloração *Picrosirius Red*, sob aplicação de 100 vezes (10X lente objetiva; 10X lente ocular). A deposição de colágeno total no infiltrado de tecido fibrovascular nos implantes subcutâneos nos camundongos foi avaliada após o tratamento intraesponja com PBS (A); BpLec 10 ng (B); BpLec 100 ng (C) e BpLec 1000 ng (D). As imagens foram analisadas no software Image J. Fibras tipo I se apresentam-se como fibras grossas na cor vermelha, fibras tipo III apresentam-se em feixes finos na cor amarelo-esverdeado.

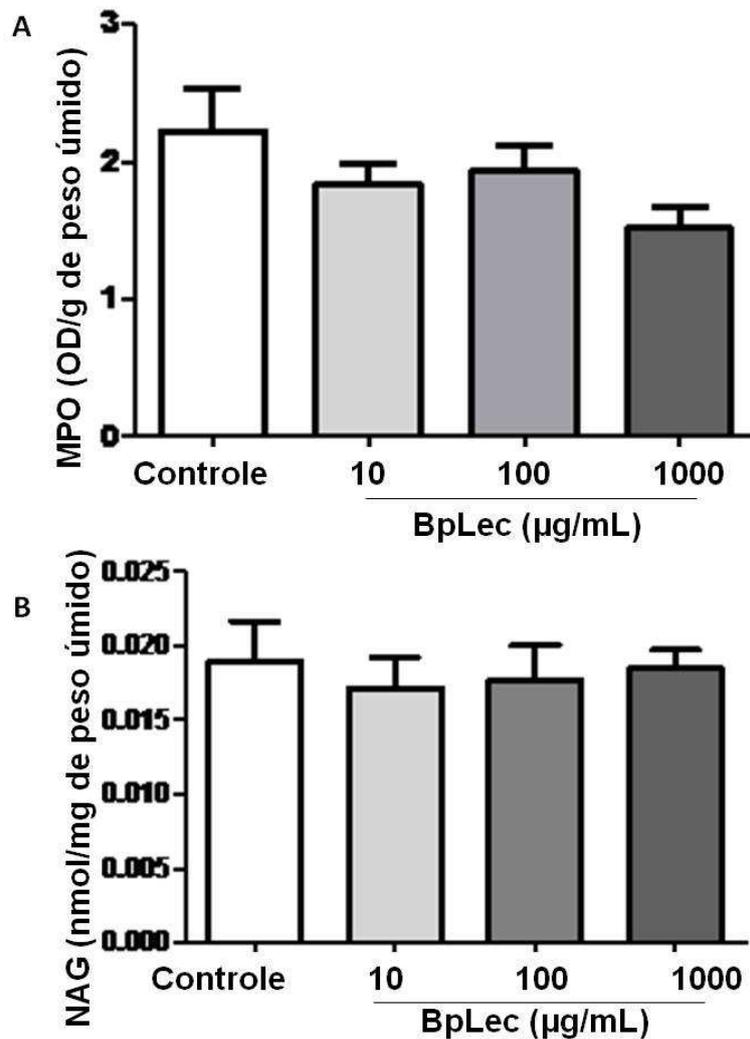


Figura 8: Avaliação dos efeitos de BpLec sobre marcadores inflamatórios
 Sobrenadantes coletados da extração de hemoglobina foram usados na mensuração das atividades enzimáticas da mieloperoxidase (MPO) (A) e N-acetil-D-glicosaminidase (NAG) (B) por densidade óptica. (*) representa diferenças estatísticas entre o controle PBS e BpLec ($p < 0,005$; ANOVA).

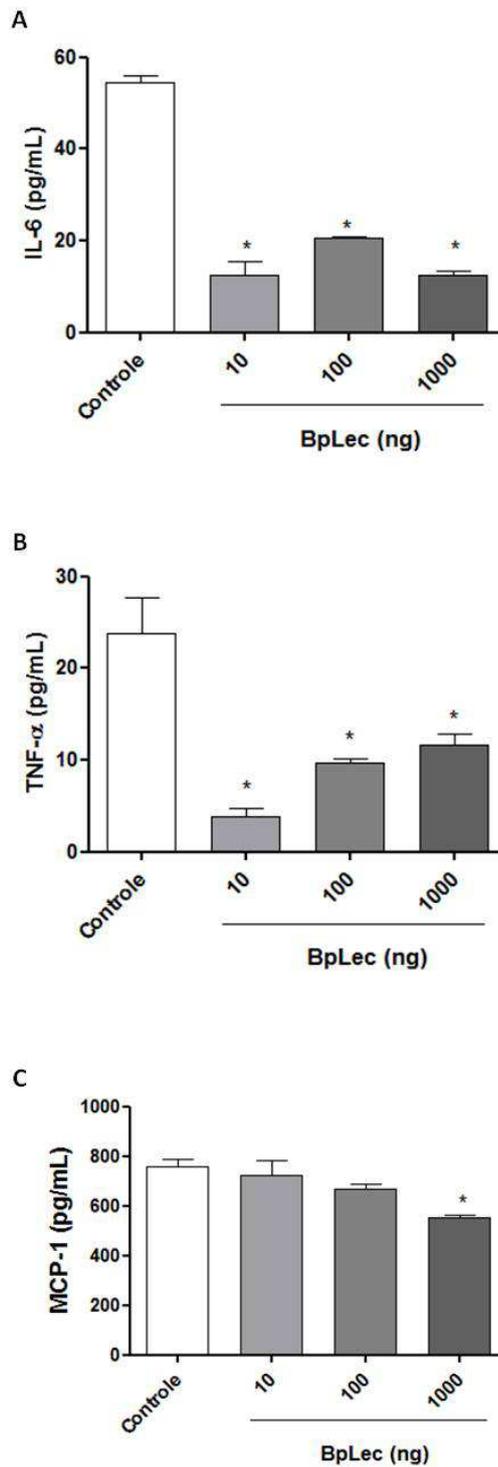
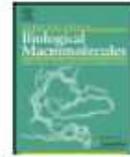


Figura 9: Interferência de BpLec sobre a liberação de citocinas. A quantificação da secreção de citocinas foi determinada por CBA (*Cytometric Bead Array*), após a remoção das esponjas, que foram subsequentemente

homogeneizadas em PBS pH 7,4 contendo Tween 0,005% (v/v), e centrifugadas a 10000 g por 30 minutos. Sobrenadantes foram coletados e agrupados para a detecção de IL-6 (A), TNF- α (B) e MCP-1 (C) utilizando-se *CBA Mouse Inflammation Kit* (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). (*) representa diferenças estatisticamente significantes entre o controle PBS e os tratamentos com BpLec ($p < 0,005$; ANOVA).



Insights into anti-parasitism induced by a C-type lectin from *Bothrops pauloensis* venom on *Toxoplasma gondii*



Letícia Castanheira^{a,d}, Dayane Lorena Naves de Souza^a, Rafaela José Silva^b,
Bellisa Barbosa^b, José Roberto Mineo^c, Kelly Aparecida Tudini^a, Renata Rodrigues^a,
Eloísa Vieira Ferro^b, Veridiana de Melo Rodrigues^{a,d,*}

^a Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia, MG, Brazil

^b Laboratório de Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia, MG, Brazil

^c Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia, MG, Brazil

^d INCT, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nano-Biofarmacêutica, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 July 2014

Received in revised form

23 November 2014

Accepted 27 November 2014

Available online 22 December 2014

Keywords:

C-type lectin

Snake venom

Toxoplasma gondii

ABSTRACT

Here we evaluate the effects of BpLec, a C-type lectin isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom, on *Toxoplasma gondii* parasitism. BpLec (0.195–12.5 µg/mL) did not interfere with HeLa (host cell) viability by MTT assay, whereas higher doses decreased viability and changed HeLa morphology. In addition, the host cell treatment before infection did not influence adhesion and proliferation indexes. BpLec did not alter *T. gondii* tachyzoite viability, as carried out by trypan blue exclusion, but decreased both adhesion and parasite replication, when tachyzoites were treated before infection. Galactose (0.4 M) inhibited the BpLec effect on adhesion assays, suggesting that BpLec probably recognize some glycoconjugate from *T. gondii* membrane. Additionally, we performed cytokine measurements from supernatants collected from HeLa cells infected with *T. gondii* tachyzoites previously treated with RPMI or BpLec. MIF and IL-6 productions by HeLa cells were increased by BpLec treatment. Also, TGF-β1 secretion was diminished post-infection, although this effect was not dependent on BpLec treatment. Taken together, our results show that BpLec is capable of reducing *T. gondii* parasitism after tachyzoite treatment and may represent an interesting tool in the search for parasite antigens involved in these processes.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Toxoplasmosis presents a high infection rate of 1/3 of the seropositive population worldwide, associated with death in many cases [1]. In Brazil, seroprevalences up to 84% have been reported in children, while pregnant women (between 36% and 92%) may be seropositive as well, depending on the Brazilian region studied. These values indicate Brazil as one of the countries with the highest seroconversion rates for toxoplasmosis [2]. It has also been stated that the pathogenesis is more severe in Brazilian children than in Europeans [2,3]. Other findings demonstrate a high infection rate in human and animal populations from Minas Gerais State, in Southeast Brazil, emphasizing the importance of investigating this disease in the country [4].

The development of new drugs for toxoplasmosis treatment is fundamental considering that its most common therapy, a combination of sulfadiazine and pyrimethamine, displays many side effects [5]. In this way, new alternatives for toxoplasmosis treatment should be of keen interest. Many studies have demonstrated the use of snake venom toxins in biotechnological applications such as disease therapy, more specifically for hypertension, thrombosis, cancer and antiparasitism, among others [6–9]. Furthermore, snake venom toxins have been designated as structural models for targeting commercial drugs [10,11].

Lectins are non-enzymatic proteins known for recognizing and specifically binding carbohydrates in a non-covalent, but reversible manner [12]. They are present in different organisms besides animals, from microorganisms to plants [13,14]. In snake venoms, these proteins are divided into C-type lectins and C-type lectin-like [15]. C-type lectins are carbohydrate-binding homodimers, usually galactose-binding, which present a calcium-ligand loop that is crucial for their biological activity [16]. As a consequence of its property of binding to cell membrane carbohydrates, lectins from different

* Corresponding author at: Pará Avenue 1720, CEP 38400-902, Uberlândia, MG, Brazil. Tel.: +55 34 32182203x22; fax: +55 34 32182203x24.
E-mail address: veridiana@ingeb.ufu.br (V. de Melo Rodrigues).

organisms can be useful as glycoconjugate markers in many cell types [17–19].

Toxoplasma gondii virulence is influenced by many glycoproteins from its micronemes, rhoptries and dense granules [20]. Despite glycosylation being thought to be rare in *T. gondii*, glycoproteins are relatively abundant in RH strain tachyzoites and may participate in disease progression [18]. Many of these glycoproteins are involved in parasite attachment to its host cell, as well as in the invasion process, and were identified by techniques employing the association with lectins, such as Concanavalin A (ConA), wheat germ agglutinin (WGA) and jacalin. Proteins from tachyzoite glideosome were also recognized by ConA, suggesting that treatment with the isolated lectin would interfere with parasite functions [17,18]. Interestingly, a lectin from *Dolichos biflorus* (DBA) specific for N-acetylgalactosamine has been used to identify *T. gondii* bradyzoite differentiation and for quantifying cysts even at low concentrations [5,21,22].

In addition, proteomic analyses with lectin association are also employed not only for understanding the mechanisms of parasite infection, but also for detecting new drug targets in the parasite membrane [23]. Several studies use lectin labeling to detect glycoproteins existent in *T. gondii* tachyzoites and bradyzoites, but experiments demonstrating these lectins' effects on parasite functions remain to be unraveled [17,18].

In this regard, we have investigated the antiparasite effects of BpLec, a C-type lectin isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom [24]. This protein is capable of inhibiting Gram-positive bacteria growth and agglutinating cat and dog erythrocytes and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes as well. Given its previously demonstrated biological activities, in the present work we demonstrate the effects of BpLec upon *T. gondii* tachyzoite adhesion and proliferation.

2. Materials and methods

2.1. BpLec purification

The C-type lectin named BpLec was purified from *B. pauloensis* snake venom, as described by [24]. Briefly, crude dried venom from *B. pauloensis* was dissolved in Tris saline buffer containing calcium chloride (CTBS: 150 mM NaCl, 20 mM Tris, 5 mM CaCl₂, pH 7.4) and centrifuged twice at 2450 × g during 10 min each, at 4 °C, for excluding insoluble material. The sample was applied to an affinity agarose column immobilized with D-galactose (0.5 cm × 4 cm, Pierce, USA) and incubated for approximately 1 h. The column, which was previously equilibrated with CTBS, was initially eluted with the same buffer, and later 0.4 M D-galactose was added to the solution for lectin obtention. Subsequently, in order to removing the carbohydrate, BpLec was subjected to an exclusion chromatography on two coupled desalting G-25 columns (1.5 × 2.5 each, GE HealthCare, Sweden), equilibrated and eluted with 0.1 ammonium bicarbonate, at a flow rate of 0.5 ml/min, collecting 500 µl in each tube.

2.2. Cell culture

The HeLa cell line was obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and cultured in 75 cm² flasks with RPMI-1640 medium (GIBCO, Paisley, UK), supplemented with 25 mM HEPES, 23 mM sodium carbonate, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Cultilab, Campinas, Brazil) in a humidified incubator at 37 °C and 5% CO₂ [25]. Tachyzoites of the *T. gondii* RH strain were initially obtained from peritoneal exudates of previously infected Swiss mice [26] and

maintained by serial passages in HeLa cells cultured in the same medium with 2% heat-inactivated fetal bovine serum, in order to obtain *in vitro* parasites [25]. In this regard, parasites were infected in HeLa, where they replicated and evade to the medium. The medium containing evaded tachyzoites was centrifuged and parasites were obtained from the pellet for further experiments.

2.3. HeLa viability

The cytotoxic effects of BpLec upon HeLa were assayed based on mitochondrial oxidation of the MTT reagent (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue) (Sigma), according to [27], with some modifications. HeLa (3 × 10⁴ cells/ml) was plated on a 96-well culture plate and BpLec (0.195–100 µg/ml) was incubated with the cells in serial twofold dilutions in the next day. After 24 h of incubation in a humidified incubator (37 °C and 5% CO₂), the supernatants were discarded and 10 µl of MTT reagent (0.5 mg/ml) were added to each well and maintained in the humidified incubator during 3 h. Afterward, formazan crystals were solubilized by 10% SDS in 50% dimethylformamide and the absorbance measured at 570 nm after 30 min. This assay was performed in triplicate.

2.4. RH strain viability

T. gondii (4 × 10⁶ tachyzoites/ml) was treated with BpLec (2.5 µg/ml, 5.0 µg/ml and 10 µg/ml) during 30 min and dyed by trypan blue. Viable cells, which present a clear cytoplasm and exclude trypan blue staining, were counted in an optical microscope [28]. RPMI-treated tachyzoites were considered as a control. The assay was performed in triplicate.

2.5. Adhesion

In this assay, two treatment approaches were carried out separately: BpLec (3.125 µg/ml, 6.25 µg/ml and 10.0 µg/ml) was incubated with HeLa during either 1 or 24 h and non-treated parasites were added later. The other approach was based on incubating tachyzoites with BpLec (2.5 µg/ml, 5.0 µg/ml and 10 µg/ml) during 30 min before infection, without treating HeLa cells. Each assay was implemented using one of these treatments exclusively. Also, for testifying BpLec specificity, all BpLec doses from tachyzoite treatment were inhibited with 0.4 M galactose during 30 min. As a control, tachyzoites or HeLa were also treated with only RPMI medium. Briefly, as suggested by [29], HeLa (2 × 10⁴ cells/ml) was plated in a 24-well culture plate containing 13 mm cover slips in each well. In the following day, cells were fixed with 8% paraformaldehyde/4% PBS during 30 min and, after extensive washing in PBS for removing this solution, *T. gondii* tachyzoites (1 × 10⁵ cells/ml) were added to each well. After 3 h of interaction, the parasites were also fixed overnight, after an extensively washing to discard the excess of *T. gondii* that did not adhere to HeLa. In the next day, the cover slips were stained with toluidine blue. On each slip, 200 cells were counted in the light microscope and the following parameters were analyzed: the number of cells with adhered parasites and the total number of parasites adhered to those cells. Three independent experiments in triplicate were accomplished for each treatment approach.

2.6. Proliferation

Both parasite and HeLa treatments were also performed separately, as described above. The assay was based on the β-galactosidase reaction, according to [30], with some modifications. HeLa (2 × 10⁴ cells/ml) was plated on a 96-well culture plate and incubated or not with BpLec (3.125 µg/ml, 6.25 µg/ml and

10.0 µg/mL overnight in a humidified incubator (37 °C and 5% CO₂). Later, the supernatant was discarded and RPMI- or BpLec-treated tachyzoites (1.5×10^5 parasites/mL) were added to each well and incubated for 24h. Supernatants were collected for cytokine analysis and cells were incubated with 50 µL of lysis

buffer (100 mM HEPES, 1 mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 5 mM dithiothreitol) during 15 min. Afterward, the lysates were mixed with 160 µL of assay buffer (100 mM phosphate buffer pH 7.3, 102 mM β-mercaptoethanol, 9 mM MgCl₂) and, subsequently, with 40 µL of 6.25 mM CPRG (chlorophenol red-β-D-galactopyranoside;

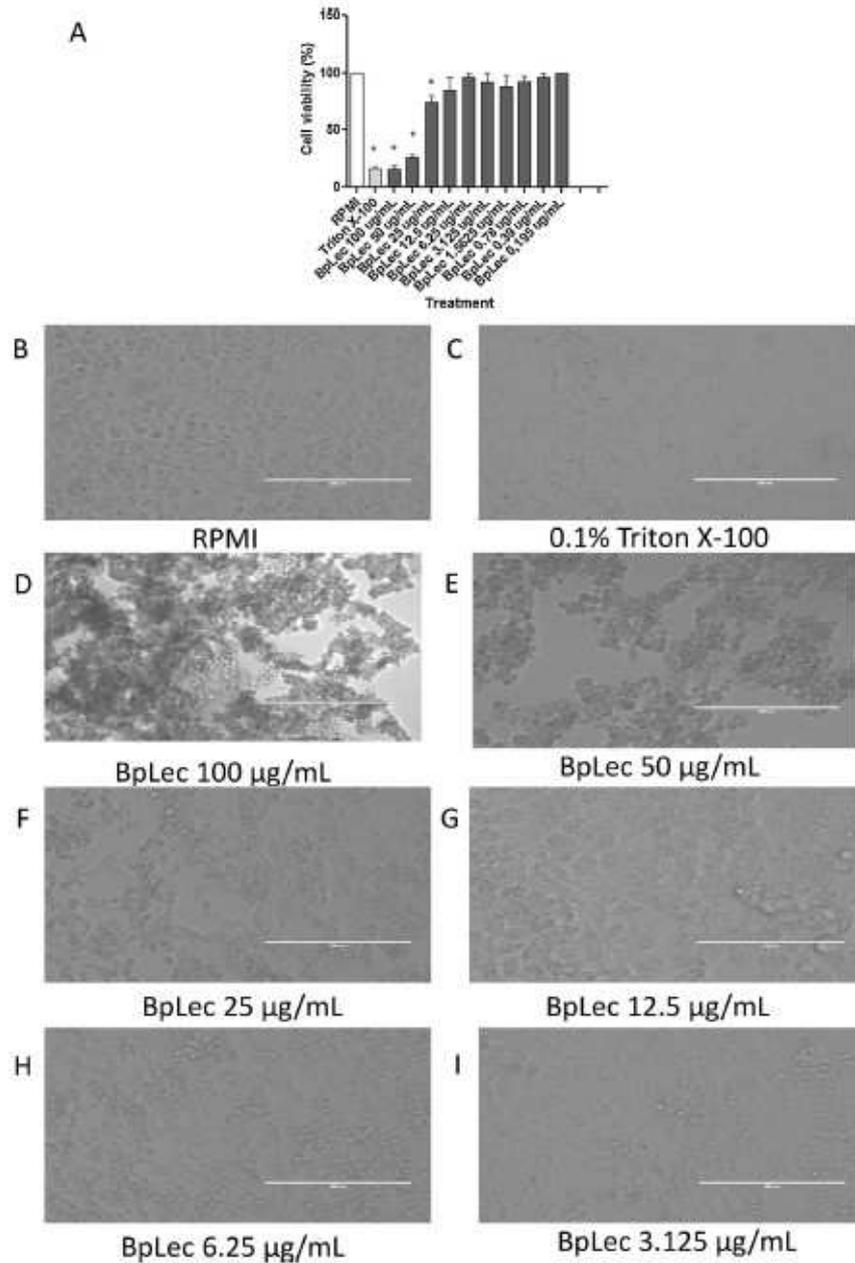


Fig. 1. Effects of BpLec on HeLa viability carried out by MTT assay. Triton X-100 was used as a positive and RPMI medium as a negative controls for cell death. (*) Significant differences between the negative control and treatments with 0.1% Triton X-100 and BpLec (A) ($P < 0.05$; ANOVA). Morphological alterations, shown by microscopy, in HeLa provoked by RPMI control (B), 0.1% Triton X-100 (C) and BpLec treatments ranging from 100 to 3.125 µg/mL (D–I).

Roche, Indianapolis, IN, USA). Reading was accomplished at 570 nm. The data are shown as the number of tachyzoites determined by Microplate Manager Software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), using a standard curve with known tachyzoite concentrations.

2.7. Cytokine determination

Briefly, HeLa (2×10^4 cells/mL) was plated on a 96-well plate and treated with BpLec (3.125 μ g/mL, 6.25 μ g/mL and 10.0 μ g/mL) during 24 h. After this, supernatants were collected for cytokine measurement. Also, tachyzoites treated or not with BpLec (2.5 μ g/mL, 5.0 μ g/mL and 10 μ g/mL) were incubated with non-treated HeLa during 24 h and the supernatants were collected as well. Cytokines were measured from these supernatants by ELISA according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences, San Jose, California, USA). The limit of detection was 4.7 pg/mL for IL-6 and IFN, 7.8 ng/mL for IL-12 p70 and IL-10, 62.5 pg/mL for MIF, and 125 ng/mL for TGF- β 1.

2.8. Statistical analysis

All data were evaluated as mean \pm standard error of the mean from three independent experiments performed in triplicate. Differences between treatments and controls were analyzed by ANOVA with multiple comparisons by Bonferroni, using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). Statistical significance was established when $P < 0.05$.

3. Results and discussion

Toxoplasmosis is a disease widely distributed in Brazil that presents high mortality rates. Morbidity due to congenital toxoplasmosis has been reported to be higher in Brazil than in other parts of the world and the clinical manifestations include neurological disease, ocular lesions and hearing loss [2,3]. Studies to gain knowledge about the pathology and factors associated with the progression and/or suppression of the disease are essential in the country.

The effects of snake venoms toxins on toxoplasmosis were previously demonstrated by Bastos et al. [31]. The authors showed that newwedase, a metalloproteinase isolated from *B. pauloensis* snake venom, reduced the invasion and replication rates of *T. gondii* tachyzoites treated before and after infection. This study encouraged us to evaluate the effects of a C-type lectin (BpLec) isolated from *B. pauloensis* snake venom [24] in the adhesion and proliferation of *T. gondii*.

BpLec was not cytotoxic to HeLa cells in doses between 0.195 μ g/mL and 12.5 μ g/mL, determined by MTT assay. On the other hand, doses higher than 25 μ g/mL decreased HeLa viability and induced morphological alterations (Fig. 1). CaL, a lectin isolated from the marine sponge *Cinachyrella apion*, also inhibited HeLa proliferation in a dose-dependent manner, but lower doses (up to 0.5 μ g/mL) were sufficient to alter cell viability [6]. According to the data evaluated in this work, doses of 3.125 μ g/mL, 6.25 μ g/mL and 10.0 μ g/mL of BpLec were chosen for further experiments. HeLa treatment (1 or 24 h) before infection did not show any effects in either adhesion (Fig. 2A and B) or proliferation assays (Fig. 2C).

BpLec at 2.5 μ g/mL, 5.0 μ g/mL and 10.0 μ g/mL did not interfere with tachyzoite viability (Table 1), although it was able to decrease parasite adhesion when tachyzoites were treated for 30 min before infection, reducing the number of cells with adhered parasites (Fig. 3A) as well as the total number of parasites adhered to these cells (Fig. 3B). These reducing BpLec effects in adhesion assay were inhibited by 0.4 M galactose (Fig. 3). Castanheira et al. [24] showed that these same BpLec doses were able to agglutinate *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes, another parasite from the

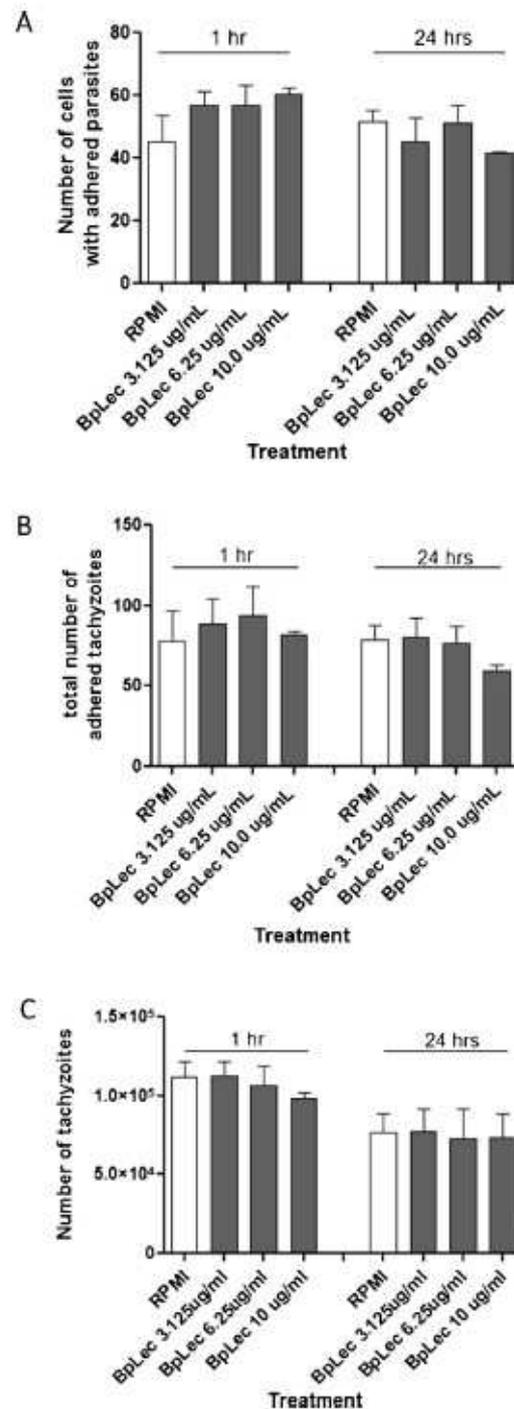


Fig. 2. *T. gondii* adhesion (A and B) and proliferation (C) assays after treating host cells with BpLec (3.125 μ g/mL, 6.25 μ g/mL and 10 μ g/mL) during 1 or 24 h before parasite infection. (*) Significant differences between cells treated with RPMI or BpLec ($P < 0.05$; ANOVA).

Table 1

T. gondii tachyzoites viability treated or not with BpLec, determined by trypan blue exclusion.

Treatment	Cell viability (%)
RPMI	100
BpLec 10 µg/ml	100
BpLec 5 µg/ml	100
BpLec 2.5 µg/ml	100

Apicomplexa phylum. This effect could be explained by an interaction between the carbohydrate recognition domain present in BpLec and some glycoconjugates present on the surface of the parasite. As the authors demonstrated [24], this cell agglutination induced by BpLec is inhibited by D-galactose or β-galactosides, so we hypothesize that BpLec probably recognize some glycoconjugates from *T. gondii* membrane which contain one of these carbohydrates in their structure.

Glycosylation is a key step in a number of processes at the cellular level, such as cell attachment, migration and invasion [32]. Invasion of host cells by Apicomplexan parasites is initiated by

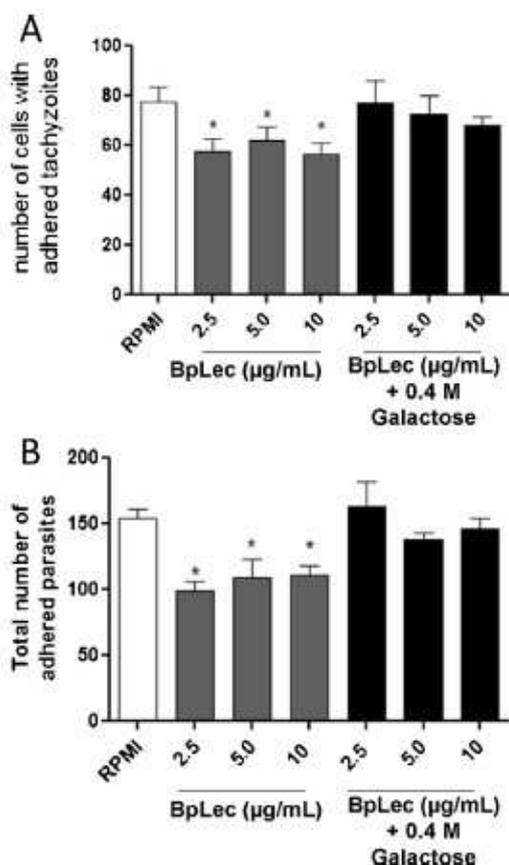


Fig. 3. Effect of BpLec incubated or not with 0.4M galactose on *T. gondii* tachyzoite adhesion to host cells (HeLa). This assay was evaluated in terms of number of HeLa cells with adhered parasites (A) and the total number of adhered parasites (B) on a total of 200 HeLa cells per lamina, performed in three independent experiments, all in triplicate. Non-treated tachyzoites were considered as the control, using only RPMI medium instead of BpLec solutions. (*) Significant differences between tachyzoites treated with RPMI or BpLec ($P < 0.05$; ANOVA).

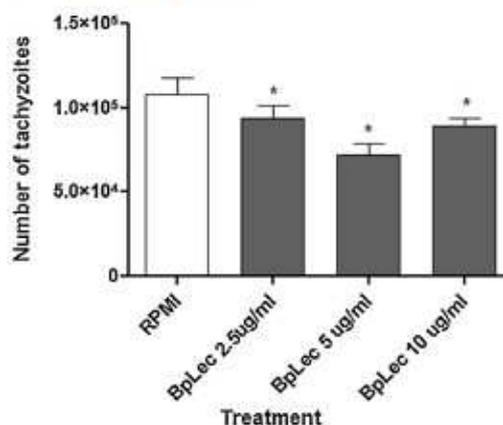


Fig. 4. Effect of BpLec on *T. gondii* tachyzoite proliferation determined by β-galactosidase measurement 24 h post-infection. Non-treated tachyzoites were considered as the control by using only RPMI medium instead of BpLec solutions. (*) Significant differences between tachyzoites treated with RPMI or BpLec ($P < 0.05$; ANOVA).

interactions with host cell receptors that are influenced by proteins secreted from micronemes, engaging the parasite with the host cell surface [33]. This process is mediated by surface-surface interactions, so we suppose that BpLec might recognize some glycoprotein in the tachyzoite membrane, invalidating its adhesion to HeLa. It is known that the tachyzoite surface is mostly composed of proteins, so called surface antigens (SAGs) [34]. For example, SAG3 is a known glycoprotein from RH strain membrane that has been implicated in directly participating in the attachment-invasion of the parasite to the host cells *in vitro* [35,36].

BpLec was also capable of decreasing parasite proliferation as assessed by β-galactosidase measurement, but this effect was not dose-dependent (Fig. 4). Luo et al. [18] demonstrated that some lectins with different specificities recognize RH tachyzoite membrane and cytoplasmatic glycoepitopes. Amongst these proteins, some related to the invasion process were identified by jacalin, a lectin that interacts with D-galactose as BpLec also does. These jacalin-recognized proteins include Gra2 or p28, Gra7, ROP4, ROP16, TgRON5, TgSUB2 and toxofilin, which are related to parasitophorous vacuole generation and moving junction composition [18]. However, the membrane proteins and those secreted by organelles which are recognized by BpLec remain to be further determined, as well as whether this recognition is the event responsible for the impairment of parasite adhesion and replication provoked by BpLec treatment.

Considering that *T. gondii* is an intracellular parasite known for influencing host resistance by affecting functions of various immune cell types [37], we collected supernatants from proliferation assays in order to measure cytokine production by HeLa. Also, HeLa cells were treated with BpLec (2.5 µg/mL, 5.0 µg/mL and 10 µg/mL) during 24 h and supernatants were collected for evaluating the basal cytokine production induced by BpLec. IL-10, IL-12 and IFN-γ levels were below detection limits (data not shown). IL-6 secretion by HeLa was increased post-infection by RPMI- and BpLec-treated tachyzoites (Fig. 5A). BpLec (5.0 µg/mL and 10 µg/mL) induced higher IL-6 secretion when compared with RPMI-treated tachyzoites. This cytokine has been correlated with parasitism control in toxoplasmosis, corroborating with BpLec effects on tachyzoites shown here [38,39].

Otherwise, all toxin doses used in tachyzoites treatment were capable of decreasing macrophage migration inhibitory factor

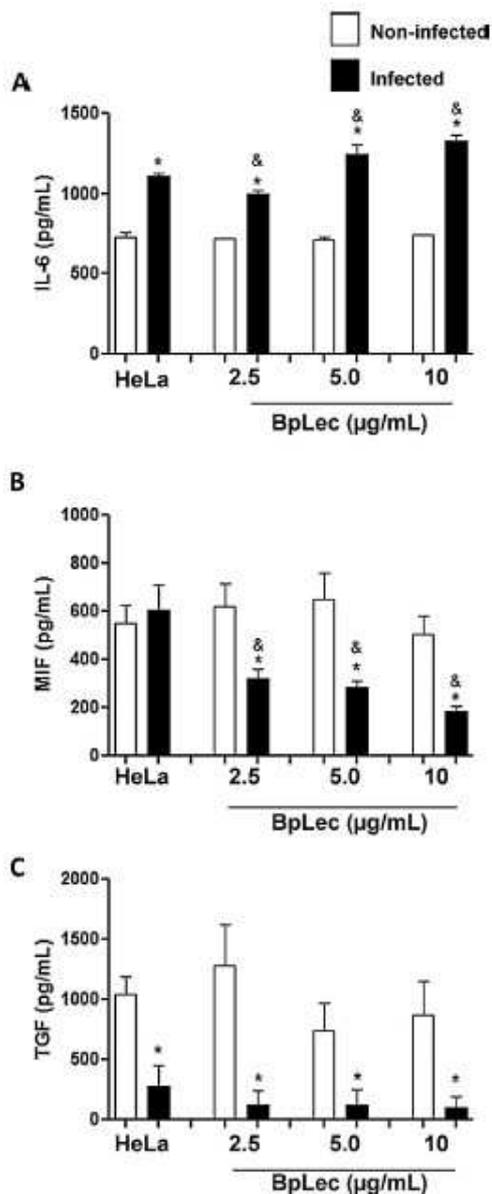


Fig. 5. Cytokine measurements from supernatants collected from HeLa cells infected with *T. gondii* tachyzoites previously treated with RPMI or BpLec. The basal cytokine production from HeLa cells treated or not with BpLec (2.5 μg/mL, 5.0 μg/mL and 10 μg/mL) is shown in white bars and is designated as non-infected. The black bars represent infected HeLa cells after the treatment of tachyzoites with RPMI or BpLec (2.5 μg/mL, 5.0 μg/mL and 10 μg/mL) during 30 min before infection. (A) IL-6, (B) MIF and (C) TGF-β1 productions were measured by ELISA (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Significant differences between non-infected and infected cells (*) and between tachyzoites treated with RPMI or BpLec (&) ($P < 0.05$; ANOVA).

(MIF) production in a dose-dependent manner (Fig. 5B), whereas RPMI-treated infection did not interfere with MIF production. In contrast to our results, it was notice somewhere that MIF levels were higher when HeLa was infected with *Neospora caninum*, an

Apicomplexan parasite closely related to *T. gondii* [40]. In addition, the authors proposed that *N. caninum* and *T. gondii* possess different mechanisms of invasion and evasion, which could result in a distinctive cytokine secretion profiles after infection [40]. This disagreement may be due to controversy surrounding MIF function in protozoan diseases [41].

MIF plays a critical role in controlling toxoplasmosis infection, reducing mortality, and is probably involved in host resistance, as shown in patients who died of encephalitic toxoplasmosis [42,43]. BpLec decreases MIF secretion by the host cell, probably by interacting with proteins in the surface of parasite membrane related to induction of MIF production and/or secretion. In addition, we suggest that BpLec could potentially antagonize controlling effects of MIF in toxoplasmosis as a parasite strategy for growing in an environment of reduced adhesion and proliferation, although further assays correlating decreased MIF secretion induced by BpLec with parasitism control are required.

RPMI- and BpLec-treated tachyzoites decreased transforming growth factor-β1 (TGF-β1) levels produced by HeLa cells (Fig. 4C), indicating that this fact is probably caused by parasite contact with host cells and is possibly not exclusively related to the action of BpLec. TGF-β1 may be considered both pro- and anti-inflammatory; this effect is parasite species-specific and presents no beneficial clinical effects in *T. gondii* [44]. TGF-β1 plays a pro-inflammatory role when found at low concentrations, which could imply that the decreased TGF-β1 noted here is a strategy of host cells to defend against *T. gondii* parasitism [45]. In this regard, as BpLec reduced the adhesion of and invasion by tachyzoites, reduced expression of TGF-β1 is expected. Moreover, TGF-β1 enhances parasite replication in retinal pigment epithelial cultures and is associated with immunopathogenesis in animal models of ocular toxoplasmosis [46]. Considering these data, we might hypothesize that reduced levels of TGF-β1 secretion would result in impaired tachyzoite proliferation, corroborating that it would represent a preventive infection strategy for host cells.

On the other hand, Awandare et al. [47] demonstrated that coupled depletion of MIF and TGF-β1 levels in children with falciparum malaria enhanced disease severity. The same action was observed in the present work, but whether BpLec causes some modifications in toxoplasmosis pathogenesis remains to be established. Since few cytokines were detected, we could not delineate a cytokine profile induced by BpLec treatment, as well as it is difficult to correlate with parasite functions altered by the toxin. However, our results open new perspectives on searching for parasite proteins or even cytokine antigens that are recognized by BpLec. In this regard, a proteomic approach focusing on possible BpLec targets in the parasite structure is well suited for further studies.

4. Conclusions

BpLec was shown to be of great biotechnological interest since low concentrations of this protein do not display cytotoxic effects to the host cell or parasites, although they interfered with parasite functions when tachyzoites were treated before infection. Taken together, these data suggest that lectin treatment would not induce adverse events in the host, but would be effective in decreasing parasite invasion and replication.

Conflicts of interest

The authors attest that there are no potential conflicts of interest and all of them contributed to the research and/or manuscript preparation and approved its final version.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the technical support of the Institute of Genetics and Biochemistry (INGEB/UFU) and the Institute of Biomedical Science (ICBIM/UFU) of the Federal University of Uberlândia. We are also thankful for the financial support of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

- [1] J.G. Montoya, O. Liesenfeld, *Lancet* 363 (2004) 1965–1976.
- [2] J.P. Dubey, E.G. Lago, S.M. Genmani, C. Su, J.L. Jones, *Parasitology* 139 (2012) 1375–1424.
- [3] R.E. Gilbert, K. Freeman, E.G. Lago, L.M. Bahia-Oliveira, H.X. Tan, M. Wallon, W. Buffolano, M.R. Stanford, E. Petersen, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2 (2008) e277.
- [4] A.C. Carneiro, G.M. Andrade, J.G. Costa, B.V. Pinheiro, D.V. Vasconcelos-Santos, A.M. Ferreira, C. Su, J.N. Januário, R.W. Vitor, *J. Clin. Microbiol.* 51 (2013) 901–907.
- [5] J.D.A. Portes, C.D. Netto, A.J. da Silva, P.R. Costa, R.A. DaMatta, T.A. dos Santos, W. De Souza, S.H. Seabra, *Vet. Parasitol.* 186 (2012) 261–269.
- [6] L. Rabelo, N. Monteiro, R. Serquiz, P. Santos, R. Oliveira, A. Oliveira, H. Rocha, A.H. Morais, A. Uchima, E. Santos, *Mar. Drugs* 10 (2012) 727–743.
- [7] S. Bhattacharya, P. Ghosh, T. De, A. Gomes, A.A. Gomes, S.R.S.R. Durgam, *Exp. Parasitol.* 135 (2013) 126–133.
- [8] A.B. Cecilio, S. Caldas, R.A. Oliveira, A.S. Santos, M. Richardson, G.B. Naumann, F.S. Schneider, V.G. Alvarenga, M.I. Estevão-Costa, A.I. Fuly, J.A. Ebbin, E.F. Sanchez, *Toxins* 5 (2013) 1780–1798.
- [9] A.S. Roug, H.O. Larsen, L. Norderby, T. Just, G. Brown, C.G. Nyvold, H.B. Ommen, P. Hokland, *Br. J. Haematol.* 164 (2014) 212–222.
- [10] A. Gomes, P. Bhattacharjee, R. Mishra, A.K. Biswas, S.C. Dasgupta, B. Giri, *Indian J. Exp. Biol.* 48 (2010) 93–103.
- [11] R.M. Kim, *J. Thromb. Haemost.* 1 (2011) 195–208.
- [12] U. Kishore, P. Eggleton, K.H.M. Reid, *Matrix Biol.* 15 (1997) 583–592.
- [13] H. Liu, N. Sharon, *Annu. Rev. Biochem.* 55 (1986) 35–67.
- [14] P. Utarabhand, W. Rittidach, N. Pajjit, *Sci. Asia* 33 (2007) 41–46.
- [15] K.J. Clemenson, T. Morita, R. Manjunatha Kim, *J. Thromb. Haemost.* 7 (2009) 360.
- [16] A.N. Zelensky, J.E. Gready, *FEBS J.* 272 (2005) 6179–6217.
- [17] S. Fauquenoy, W. Morelle, A. Ilvoasse, A. Bednarczyk, C. Slomianny, C. Schaeffer, A. Van Dorsselaer, S. Tomavo, *Mol. Cell. Proteomics* 7 (2008) 891–910.
- [18] Q. Luo, R. Upadhyay, H. Zhang, C. Madrid-Aliste, E. Nieves, K. Kim, R.H. Angeletti, L.M. Weiss, *Microbes Infect.* 14–15 (2011) 1199–1210.
- [19] J. Hirabayashi, A. Kuno, H. Tateno, *Electrophoresis* 22 (2011) 1118–1128.
- [20] M.B. Melo, K.D. Jensen, J.P. Saeij, *Trends Parasitol.* 27 (2011) 487–495.
- [21] M. Matrajt, R.G. Donald, U. Singh, D.S. Roos, *Mol. Microbiol.* 44 (2002) 735–747.
- [22] D. Aldebert, M. Hippeliste, P. Cavailles, B. Touquet, P. Flori, C. Loeuillet, M.F. Cesbron-Delauw, *Cytometry A* 79 (2011) 952–958.
- [23] F.Y. Che, C. Madrid-Aliste, B. Burd, H. Zhang, E. Nieves, K. Kim, A. Fiser, R.H. Angeletti, L.M. Weiss, *Mol. Cell. Proteomics* 10 (2011), <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M110.000745>.
- [24] L.E. Castanheira, D.C. Nunes, T.M. Cardoso, P.D.S. Santos, L.R. Goulari, R.S. Rodrigues, M. Richardson, M.H. Borges, K.A. Yoneyama, V.M. Rodrigues, *Int. J. Biol. Macromol.* 54 (2013) 57–64.
- [25] B.F. Barbosa, D.A.O. Silva, L.N. Costa, J.R. Mineo, E.A.V. Ferro, *Clin. Exp. Immunol.* 151 (2008) 536–545.
- [26] J.R. Mineo, L.H. Kasper, *Exp. Parasitol.* 79 (1994) 11–20.
- [27] T. Mosmann, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.
- [28] W. Strober, *Curr. Protoc. Immunol. Appendix 3* (2001) (Appendix 3B).
- [29] J.G. Oliveira, N.M. Silva, A.A. Santos, M.A. Souza, G.L. Ferreira, J.R. Mineo, E.A. Ferro, *Placenta* 27 (2006) 691–698.
- [30] C.F. Teo, X.W. Zhou, M. Bogoy, V.B. Carruthers, *Antimicrob. Agents Chemother.* 51 (2007) 679–688.
- [31] L.M. Bastos, R.J. Júnior, D.A. Silva, J.R. Mineo, C.U. Vieira, D.N. Teixeira, M.I. Homai-Brandenburg, V.M. Rodrigues, A. Hamaguchi, *Exp. Parasitol.* 120 (2008) 391–396.
- [32] M. Xie, J. Hu, Y.M. Long, Z.L. Zhang, H.Y. Xie, D.W. Pang, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 1311–1317.
- [33] J.M. Santos, D. Soldati-Favre, *Cell. Microbiol.* 13 (2011) 787–796.
- [34] G.Y. Ma, J.Z. Zhang, G.R. Yin, J.H. Zhang, X.L. Meng, F. Zhao, *Exp. Parasitol.* 122 (2009) 41–46.
- [35] F. Dzierżynski, M. Mortuaire, M.F. Cesbron-Delauw, S. Tomavo, *Mol. Microbiol.* 37 (2000) 574–582.
- [36] J.F. Dubremetz, M. Lebrun, *Microbes Infect.* 14 (2012) 1403.
- [37] E.S. Bernardes, N.M. Silva, L.P. Ruak, J.R. Mineo, A.M. Loyola, D.K. Hsu, F.T. Liu, R. Chammas, M.C. Roque-Barreira, *Am. J. Pathol.* 168 (2006) 1910–1920.
- [38] Y. Suzuki, *Immunobiology* 201 (1999) 255–271.
- [39] A.S. Castro, C.M. Alves, M.B. Angeloni, A.O. Gomes, B.F. Barbosa, P.S. Franco, D.A. Silva, O.A. Martins-Filho, J.R. Mineo, T.W. Mineo, E.A. Ferro, *Placenta* 34 (2013) 240–247.
- [40] J.V. Carvalho, C.M. Alves, M.R. Cardoso, C.M. Mota, B.F. Barbosa, E.A. Ferro, N.M. Silva, T.W. Mineo, J.R. Mineo, D.A. Silva, *Int. J. Parasitol.* 40 (2010) 1629–1637.
- [41] J. de Dica Rosado, M. Rodriguez-Sosa, *Int. J. Biol. Sci.* 7 (2011) 1239–1256.
- [42] M. Flores, R. Saavedra, R. Bautista, R. Viedma, E.P. Tenorio, L. Leng, Y. Sánchez, I. Juárez, A.A. Satoskar, A.S. Shenoy, L.I. Terrazas, R. Bucala, J. Barbi, A.R. Satoskar, M. Rodriguez-Sosa, *FASEB J.* 22 (2008) 3661–3671.
- [43] C.A. Terrazas, I. Juárez, L.I. Terrazas, R. Saavedra, E.A. Calleja, M. Rodriguez-Sosa, *Exp. Parasitol.* 126 (2010) 348–358.
- [44] B. Namangala, N. Inoue, C. Sugimoto, *Jpn. J. Vet. Res.* 57 (2009) 101–108.
- [45] F.M. Omer, J.A. Kurtzhals, E.M. Riley, *Parasitol. Today* 16 (2000) 18–23.
- [46] C.N. Nagineni, B. Detrick, J.J. Hooks, *Clin. Exp. Immunol.* 128 (2002) 372–378.
- [47] G.A. Awadarm, J.B. Hittner, P.G. Krensmeyer, D.O. Ochiel, C.C. Keller, J.B. Weinberg, L.A. Clark, D.J. Perkins, *Clin. Immunol.* 119 (2006) 219–225.