



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

EVELLYNE DE OLIVEIRA FIGUEIRÔA

EFEITOS BIOLÓGICOS DE LECTINAS DE *Cratylia mollis* EM CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA HUMANO E EM PLAQUETAS

Recife, 2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

EVELLYNE DE OLIVEIRA FIGUEIRÔA

**EFEITOS BIOLÓGICOS DE LECTINAS DE *Cratylia mollis* EM CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA HUMANO E EM PLAQUETAS**

ALUNA: EVELLYNE DE OLIVEIRA FIGUEIRÔA

ORIENTADORA: MARIA TEREZA DOS SANTOS CORREIA
Departamento de Bioquímica
Centro de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Pernambuco

CO-ORIENTADOR: ANÍBAL EUGÊNIO VERCESI
Departamento de Patologia Clínica
Faculdade de Ciências Médicas
Universidade Estadual de Campinas

Recife, 2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Figueirôa, Evellyne de Oliveira

Efeitos biológicos de lectinas de *Cratylia mollis* em células de adenocarcinoma de próstata humano e em plaquetas/ Evellyne de Oliveira Figueirôa– Recife: O Autor, 2015.

143 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientador: Aníbal Eugênio Vercesi

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia, 2015.

Inclui referências

- 1. Lectinas 2. Câncer 3. Leguminosa I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orientadora) II. Vercesi, Aníbal Eugênio (coorientador) III. Título**

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-055

**EFEITOS BIOLÓGICOS DE LECTINAS DE *Cratylia mollis* EM CÉLULAS DE
ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA HUMANO E EM PLAQUETAS**

EVELLYNE DE OLIVEIRA FIGUEIRÔA

Tese de Doutorado apresentada em 18 de setembro de 2015 para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de **DOUTORA EM BIOQUÍMICA E FISILOGIA** pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Maria Tereza dos Santos Correia

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Orientadora

Profª. Drª. Patrícia Maria Guedes Paiva

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Examinadora Interna

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Examinador Interno

Prof. Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa

Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) – Examinador Externo

Drª. Elba Verônica Matoso Maciel de Carvalho

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) – Examinadora Externa

“Aquilo que persistimos em fazer torna-se cada vez mais fácil para nós, não que a natureza da coisa em si mude, mas nosso poder de realizá-la aumenta.”

HEBER J. GRANT

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por guiar minhas decisões, mesmo quando tive dúvidas sobre qual caminho seguir.

Aos meus pais, Ernani Eustáquio de Figueirôa e Maria Goreti de Oliveira Figueirôa, por todo amor, incentivo, dedicação e bons exemplos. Vocês são os principais alicerces da minha vida. **Ao meu irmão**, Ewerton de Oliveira Figueirôa, e **aos meus familiares**, pela torcida e felicidade a cada conquista minha. **Ao meu noivo**, Eduardo Rodrigues Barros Filho, por sua compreensão nos momentos em que precisamos ficar distante, me fazendo acreditar no amor que existe entre nós.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Maria Tereza dos Santos Correia, pela amizade, preocupação e, principalmente, pela liberdade que concede aos seus alunos, nos dando a oportunidade de fazer nossas próprias escolhas.

Ao Prof. Dr. Aníbal Eugênio Vercesi, pelo acolhimento no Laboratório de Bioenergética (UNICAMP) e pelo suporte científico durante todos os meses que convivemos.

Ao Prof. Dr. Roger Frigério Castilho, pela presteza, sugestões e análises críticas.

Aos colegas do Departamento de Bioquímica (UFPE), em especial Raiana Apolinário, Mychely Melo, Aline Carvalho, Elba Verônica, Aline de Paula, Renata Maria, Paulo Soares, Isabel Renata e Priscilla Sales, pela ajuda e momentos que tornaram nossa rotina muito prazerosa.

Aos colegas do Laboratório de Bioenergética (UNICAMP), Ana Carolina, Arthur Hernandez, Audrey de Moraes, Érika Rodrigues, Estela Busanello, Franco Rossato, Genoefa Dal'Bó, Guilherme Michelini, Hanan Chweih, Juliana Ronchi, Juliana Ruas, Paolo La Guardia (*in memoriam*), Rute Alves, Sílvia Ferreira e Tiago Figueira, pela grande ajuda no laboratório e nos experimentos, pelos momentos compartilhados nas apresentações de seminários científicos e discussões de resultados, que tanto acrescentaram na minha formação. **Aos funcionários do**

Laboratório de Bioenergética, Edilene Santos, Roberto Stahl e Márcia Fagian, pela total dedicação para manter um ambiente organizado.

Aos amigos, também pertencentes aos grupos da Bioquímica e/ou Bioenergética, que vou levar para sempre no coração, Cláudia Navarro, Gustavo Facchini, Raffaella Ignarro e Kézia de Moura. Vocês foram muito importantes durante minha estada em Campinas, fazendo com que nossos dias passassem mais rápido e fossem maravilhosos. Obrigada pelos almoços que sempre descontraíram as tardes que estavam por vir.

Aos meus grandes amigos, Renata Costa e Everton Lins, pelo apoio em todos os momentos e pela verdadeira amizade construída ao longo desses 11 anos. **Aos amigos**, Mary Aranda, Priscila Jacob e José Luiz Cunha, com os quais compartilhei momentos muito difíceis, como também momentos de grande diversão que jamais serão esquecidos.

Ao Fábio Arrojo, que em tão pouco tempo fez uma diferença enorme em minha vida. Obrigada pelas experiências e loucuras compartilhadas nos 2 meses que convivemos, quase que diariamente, em Campinas, por me fazer sorrir, por ser tão esperto quanto eu e por me ensinar que devemos ser honestos com o que sentimos, apesar das decepções e estresses do dia-a-dia. És muito especial para mim!

Aos colegas, Diego Montagnini, Helder Fernandes, Fernando Vieira e todos que fazem parte da Golden Fitness. Obrigada pelos conselhos, conversas, risadas e aulas após dias estressantes de experimentos. Foi com vocês que aprendi a tentar deixar o “sedentarismo” de lado!

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Bioquímica, pela dedicação e ajuda sempre tão oportuna.

À Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), à Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela infraestrutura e pelo suporte financeiro.

RESUMO

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não-imunológica que possuem a capacidade de aglutinar eritrócitos ou outras células e precipitar polissacarídeos ou outras glicoproteínas. Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 e Cramoll 4 são lectinas extraídas das sementes de *Cratylia mollis*. Cramoll 1,4 é uma mistura de Cramoll 1 e sua isoforma Cramoll 4 e rCramoll foi sintetizada pela técnica de expressão heteróloga, a partir da sequência de aminoácidos de Cramoll 1. Este trabalho objetivou avaliar a atividade indutora de morte celular das lectinas Cramoll 1,4 e rCramoll em células de adenocarcinoma de próstata humano (PC-3), além de verificar as propriedades das lectinas Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 e Cramoll 4 em aglutinar plaquetas lavadas de diferentes tipos sanguíneos humanos e de sangue de coelho. Cramoll 1,4 e rCramoll diminuíram a viabilidade das células PC-3 com o aumento das concentrações das lectinas ou do tempo de exposição. Os valores de concentrações capazes de matar 50% das células PC-3 expostas às lectinas foram 39.69 µg/mL e 29.91 µg/mL para Cramoll 1,4 e rCramoll, respectivamente. Elas apresentaram maior citotoxicidade para células PC-3 quando comparadas à lectina ConA. Tratamento com Cramoll 1,4 e com rCramoll induziu a morte celular por necrose, com um aumento de cerca de 3 vezes nos níveis de superóxido mitocondrial, bem como aumento dos níveis de cálcio citosólico. Quando utilizados inibidores da abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial não foi observada proteção das células PC-3 no processo de morte celular. Provavelmente, a morte de células PC-3 ocorreu devido aos aumentos nas concentrações de cálcio citosólico e de espécies reativas de oxigênio (EROs) mitocondrial, culminando com uma diminuição na fosforilação oxidativa, deficiência de ATP e privação de energia. Com relação à propriedade em aglutinar plaquetas, a aglutinação ocorreu em maior percentual nas plaquetas provenientes de sangue tipo A e em menor intensidade em plaquetas provenientes de sangue tipo AB e apesar da especificidade a carboidratos diferente entre Cramoll 3 e Cramoll 4, estas isoformas apresentaram semelhança quanto à promoção de aglutinação de plaquetas humanas. Quanto aos ensaios de inibição da aglutinação de plaquetas, foi observado que, na maior parte das vezes, os carboidratos específicos não inibiram completamente a aglutinação de plaquetas.

Palavras-chave: *Cratylia mollis*, Morte Celular, Necrose, Espécies Reativas de Oxigênio, Cálcio Citosólico, Aglutinação Plaquetária.

ABSTRACT

Lectins are proteins or glycoproteins of non-immune origin that have the ability to agglutinate erythrocytes or other cells and precipitating polysaccharides and glycoproteins other. Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 and Cramoll 4 are lectin extracted from seeds *Cratylia mollis*. Cramoll 1,4 is a mixture of Cramoll 1 and isoform Cramoll 4. rCramoll was synthesized by heterologous expression technique, from the Cramoll amino acid sequence 1. This study evaluated the activity of inducing cell death of lectins Cramoll 1,4 and rCramoll in human prostate adenocarcinoma cells (PC-3), and evaluate the properties of lectins Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 and Cramoll 4 washed platelets agglutinate in different human blood types and rabbit blood. Cramoll 1,4 and rCramoll decreased viability of PC-3 cells with increasing concentrations of lectins or exposure time. The values of effective concentrations to kill 50% of PC-3 cells treated were 39.69 µg/ml and 29.91 µg/mL for the lectins Cramoll 1,4 and rCramoll, respectively. They showed greater toxicity for PC-3 cells compared to the lectin ConA. Treatment with Cramoll 1,4 and rCramoll induced cell death by necrosis, with an increase about 3 times higher the levels mitochondrial superoxide as well as in cytosolic calcium levels. When used inhibitors opening of the mitochondrial permeability transition pore protection was not observed in PC-3 cells in cell death process. Probably, PC-3 cell death occurred due to these previous increases in cytosolic calcium concentrations and reactive oxygen species (ROS) mitochondrial, culminating in a decrease in oxidative phosphorylation, ATP deficiency and deprivation of energy. Platelet agglutination occurred in a higher percentage in platelets from blood type A and to a lesser intensity in platelets from blood type AB. Despite the specificity of different carbohydrates between Cramoll 3 and Cramoll 4, these isoforms were similar as to promoting platelet agglutination human. As for inhibition assays of platelet agglutination it was observed that, in most of times, the specific carbohydrate didn't completely inhibit platelet agglutination.

Keywords: *Cratylia mollis*, Cell Death, Necrosis, Reactive Oxygen Species, Cytosolic Calcium, Platelet Agglutination

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
AIF	Fator indutor de apoptose (do inglês, <i>apoptosis inducing fator</i>)
ANT	Translocador de nucleotídeos de adenina (do inglês, <i>adenine nucleotide translocator</i>)
Apaf -1	Fator ativador de apoptose 1 (do inglês, <i>apoptosis activating fator 1</i>)
ATCC	(do inglês, <i>American Type Culture Collection</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
EC₅₀	Concentração efetiva que diminui em 50% a viabilidade celular
Cramoll	Lectina de semente de <i>Cratylia mollis</i>
ConA	Concanavalina A, Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
CsA	Ciclosporina A
CyD	Ciclofilina D
DNA	Ácido desoxiribonucleico (do inglês, <i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNT	Doenças não-transmissíveis
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
Fas	Receptor mediador de apoptose
FCCP	Desacoplador mitocondrial protonóforo (do inglês, <i>Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazine</i>)
FvW	Fator de von Willebrand
GP	Glutational peroxidase
GP1a-IIa	Glicoproteínas de membrana plaquetária Ia e IIa
GP1b-IX-V	Glicoproteínas de membrana plaquetária Ib-IX e V
GP1c-IIa	Glicoproteínas de membrana plaquetária Ic e IIa
GP1Ib-IIIa	Glicoproteínas de membrana plaquetária IIb e IIIa
GPIV	Glicoproteína de membrana plaquetária IV
GPVI	Glicoproteína de membrana plaquetária VI
GR	Glutational redutase
GSH	Glutational peroxidase reduzida
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
MnSOD	Superóxido dismutase dependente de manganês

MuLL	Lectina de folha de <i>Myracrodruon urundeuva</i>
MvRL	Lectina de rizoma de <i>Microgramma vacciniifolia</i>
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo (do inglês, <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (do inglês, <i>nicotinamide adenine dinucleotide reduced</i>)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (do inglês, <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced</i>)
NO[·]	Óxido nítrico (do inglês, <i>nitric oxide</i>)
OfiL	Lectina de cladódios de <i>Opuntia ficus indica</i>
O₂^{·-}	Superóxido
OH[·]	Hidroxila
PARP-1	Poli-(ADP-ribose)-polimerase
PHA	Fitohemaglutinina, Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
Pi	Fosfato inorgânico
PSA	Antígeno prostático específico (do inglês, <i>prostate specific antigen</i>)
PTPM	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
rCramoll	Lectina recombinante de <i>Cratylia mollis</i>
SCA	Sistema canalicular aberto
TH	NAD(P) transidrogenase
TLR3	Receptor Toll-like 3 (do inglês, <i>Toll-like receptor 3</i>)
TLR4	Receptor Toll-like 4 (do inglês, <i>Toll-like receptor 4</i>)
TNF	Fator de necrose tumoral (do inglês, <i>tumour necrosis factor</i>)
TNFR1	Receptor do fator de necrose tumoral 1 (do inglês, <i>tumour necrosis factor receptor 1</i>)
TP	Tioredoxina peroxidase
TPM	Transição de permeabilidade mitocondrial
TR	Tioredoxina redutase
TRAIL	Receptor mediador de apoptose (do inglês, <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>)
TRAMP	Receptor mediador de apoptose
TSH	Tioredoxina peroxidase reduzida
TXA₂	Tromboxano A ₂

UCP	Proteína desacopladora (do inglês, <i>uncoupling protein</i>)
UQ	Coenzima Q oxidada
UQH₂	Coenzima Q reduzida
UQH[•]	Semiquinona
VDAC	Canal ânion voltagem dependente (do inglês, <i>voltage-dependent anion channel</i>)
WGA	Lectina do gérmen de trigo
WSMoL	Lectina solúvel em água de sementes de <i>Moringa oleifera</i>

LISTA DE FIGURAS

	pág
Figura 1: Sementes (A), árvore (B) e flores (C) de <i>Cratylia mollis</i>	25
Figura 2: Principais etapas para purificação das isoformas de lectinas de <i>Cratylia mollis</i>	26
Figura 3: Estrutura terciária de Cramoll 1(A), Dimerização envolvendo alinhamento antiparalelo de folhas beta (B) e tetramerização consistindo da associação de dois dímeros (C).....	27
Figura 4: Similaridade de estrutura entre as lectinas Cramoll e ConA.....	27
Figura 5: Estimativas do ano de 2014, no Brasil, das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo o sexo e a localização primária*.....	36
Figura 6: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes, no Brasil, em 2014 por sexo, exceto pele não melanoma*.....	36
Figura 7: Linhagem celular de câncer de próstata. Foto de cultura de células PC-3, obtida obtida do site da ATCC (American Type Culture Collection). Escala da barra = 100 µm.....	38
Figura 8: Esquema simplificado da cadeia respiratória e da teoria quimiosmótica aplicada à mitocôndria.....	41
Figura 9: Modelo proposto para explicar a formação do poro de transição de permeabilidade induzido por Ca^{2+} e EROs na membrana mitocondrial interna.....	49
Figura 10: Modelo esquemático da anatomia da membrana plaquetária. ZP = zona periférica; CF = camada dupla de fosfolipídeos; P = proteína; GP = glicoproteínas; R = receptor; ENZ = enzima; SM = submembrana; MT = microtúbulos.....	51

FIGURAS DO MANUSCRITO 1

	Pág
Fig. (1). Classification of lectins according to structural feature. Hevein from <i>Hevea brasiliensis</i> ; CrataBL from <i>Crataeva tapia</i> , Cramoll from <i>Cratylia mollis</i> and TxLC-1 from <i>Tulipa gesneriana</i>	100
Fig. (2). Schematic representation of ionic changes and the concentration of cytosolic and mitochondrial calcium, activation of proteolytic enzymes, opening of the mitochondrial permeability transition pore, release apoptosis inducing factors and ATP depletion in accordance with the type of cell death, apoptosis (A) or necrosis (B).....	101
Fig. (3). Model of the molecular basis on lectin-induced apoptosis. Lectins induce apoptosis mainly mitochondrial pathways in tumor cel.....	102
Fig. (4). Model of the molecular basis on lectin-induced necrosis. Lectins induce necrosis through mitochondrial pathways, increase cytosolic calcium and reactive oxygen species in tumor cells.....	103

FIGURAS DO MANUSCRITO 2

	Pág
Figure 1: ConA, Cramoll 1,4 and rCramoll reduce PC-3 cells viability.....	124
Figure 2: Cramoll 1,4 or rCramoll decreases PC-3 cells viability according to the concentration.....	124
Figure 3: Lectins decrease cell viability according to the treatment time.....	125
Figure 4: Cramoll 1,4 or rCramoll induces necrosis in PC-3 cells.....	125
Figure 5: Cramoll 1,4 or rCramoll increases mitochondrial superoxide levels in PC-3 cells.....	126
Figure 6: Treatment with Cramoll 1,4 or rCramoll (50 µg/mL) increases 340 nm/380 nm fluorescence ratio in PC-3 human prostatic tumor cells.....	127

Figure 7:	PC-3 human prostatic tumor cells death induced by Cramoll 1,4 or rCramoll can't be blunted by treatment with the MPT inhibitors Debio 025 and bongkreikic acid.....	128
Figure 8:	Lectin causes death by necrosis, probably, due to a large decrease in oxidative phosphorylation.....	129

FIGURAS DO MANUSCRITO 3

		Pág
Figure 1:	WGA e ConA promote platelet agglutination.....	139
Figure 2:	Cramoll Isoforms promote platelet agglutination.....	140

LISTA DE TABELAS

	Pág
Tabela 1: Principais glicoproteínas plaquetárias de superfície e seus ligantes.....	51

TABELA DO MANUSCRITO 1

	Pág
Table 1. Examples of the main biological activities of lectins.....	104

TABELA DO MANUSCRITO 3

	Pág
Table 1. Agglutination of washed platelets obtained from human blood and rabbit blood by commercial lectins and lectin isoforms of <i>C. mollis</i>	138

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 LECTINAS	17
1.1.1 Classificação das Lectinas	20
1.1.1.1 Classificação de acordo com a especificidade ao carboidrato	20
1.1.1.2 Classificação de acordo com a topologia do sítio ligante	20
1.1.1.3 Classificação de acordo com a estrutura molecular	21
1.1.3 Purificação e caracterização de Lectinas	22
1.1.4 Lectinas de leguminosas	24
1.1.4.1 <i>Cratylia mollis</i>	24
1.1.5 Lectinas e morte celular	30
1.2 CÂNCER	32
1.2.1 Câncer de Próstata	35
1.3 MITOCÔNDRIA	38
1.3.1 Bioenergética mitocondrial	38
1.3.2 Geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	41
1.3.3 Homeostase de Cálcio	43
1.3.4 O Processo Desencadeador de Morte Celular	45
1.3.4.1 Transição de Permeabilidade Mitocondrial e Morte Celular	47
1.4 PLAQUETAS	50
2. OBJETIVOS	54
2.1 OBJETIVO GERAL	54
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
4. MANUSCRITOS	76
4.1 MANUSCRITO 1	76
4.2 MANUSCRITO 2	105
4.3 MANUSCRITO 3	130
5. CONCLUSÕES	142

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 LECTINAS

As lectinas apresentam-se como proteínas ou glicoproteínas de origem não imunológica, as quais se ligam específica e reversivelmente a monossacarídeos ou a resíduos terminais ou subterminais de carboidratos presentes em glicoconjugados (PEUMANS *et al.*, 2001; VAN DAMME *et al.*, 1998; SHARON & LIS, 1972).

O estudo com lectinas teve início no século 19, com a descoberta de que alguns extratos aquosos de plantas, além de apresentarem toxicidade para alguns animais, também aglutinavam hemácias. Na época, acreditava-se que este efeito ocorria devido à contaminação por toxinas bacterianas. Esta hipótese foi quebrada quando, em 1884, Bruylants e Vennerman, demonstraram que a toxicidade da semente de *Abrus precatorius* devia-se a uma fração proteica que podia ser precipitada com álcool a partir do extrato aquoso, chamada abrina (MOREIRA *et al.*, 1991). A pesquisa com lectinas iniciou em 1888, quando Hermann Stillmark, um estudante de doutorado da Universidade de Dorpat, na Estônia, descobriu que extratos de *Ricinus communis* possuíam a propriedade de aglutinar eritrócitos. Ele demonstrou que o princípio ativo, responsável por esta habilidade de aglutinação de células, era uma proteína, a qual foi denominada de ricina. O termo aglutinina foi, então, disseminado para descrever moléculas que possuíam a capacidade de aglutinar eritrócitos ou outras células. Estas informações foram bastante atrativas e, na última década de 1800, Paul Ehrlich que trabalhava com as lectinas de *Ricinus communis* e de *Abrus precatorius*, introduziu estas moléculas em pesquisas que deram origem à Imunologia básica. Ele vacinou animais com pequenas doses orais de sementes de *Ricinus communis* e observou a secreção de imunoglobulinas capazes de neutralizar os antígenos das toxinas de *Ricinus communis*, além de mencionar o processo de transferência da imunidade à prole através do leite materno (KENNEDY *et al.*, 1995; SHARON, 1989). Apenas em 1954, Boyd e Shapleigh introduziram o termo “lectina” para designar um grupo de proteínas que

apresentava uma característica comum seletividade em sua interação com carboidratos (BIES *et al.*, 2004; HARTLEY *et al.*, 2004).

A partir dos anos 60, duas grandes descobertas dos pesquisadores Peter C. Nowell e Joseph C. Aub impulsionaram a pesquisa com lectinas. Nowell, em 1960, estabeleceu que a lectina de *Phaseolus vulgaris*, conhecida como fitohemaglutinina (PHA), possui a capacidade de estimular linfócitos a entrar em mitose e, que a primeira lectina vegetal purificada por Summer em 1919, a partir da semente de *Canavalia ensiformis*, conhecida como concanavalina A ou simplesmente ConA, também possui essa mesma atividade mitogênica; contudo, diferentemente da PHA, a atividade da ConA podia ser inibida por pequenas concentrações de monossacarídeos, como a manose. Aub, nos anos de 1963 e 1965, estabeleceu que a aglutinina do gérmen de trigo, denominada WGA, possui a habilidade de aglutinar, preferencialmente, células malignas. Estas investigações levaram à hipótese de que as alterações nos açúcares da superfície celular são associadas com o desenvolvimento do câncer, propondo que a alta suscetibilidade à aglutinação por lectinas era uma propriedade compartilhada por todas as células malignas (SHARON & LIS, 2004; SHARON & LIS, 1987).

Atualmente, a definição mais aceita foi proposta na metade da década de 90, quando Peumans & Van Damme conceituaram lectinas como proteínas não-pertencentes ao sistema imunológico, que possuem um sítio não catalítico de reconhecimento específico e reversível a mono ou oligossacarídeos, sem alterar a estrutura covalente das ligações glicosídicas (PEUMANS & VAN DAMME, 1995a).

Lectinas diferem entre si quanto à sequência de aminoácidos, ao requerimento de metais, ao peso molecular e à estrutura tridimensional, mas o aspecto comum entre elas é a presença de, pelo menos, um sítio específico de ligação a carboidratos, também chamado de domínio de reconhecimento de carboidrato. Elas se ligam, de maneira reversível, a carboidratos ou glicoconjugados em solução ou que estejam conectados à membrana celular (HONG *et al.*, 2001, PEUMANS *et al.*, 2001; SOUZA *et al.*, 2001; SATO *et al.*, 2000; VIJAYAN & CHANDRA, 1999; ELGAVISH & SHAANAN, 1997). Algumas lectinas possuem um único domínio de reconhecimento a carboidratos, o que não é suficiente para conferir a elas a

característica funcional de lectinas, como a hemaglutinação; porém, não as excluem de pertencer a este grupo.

Elas possuem ampla distribuição na natureza, podendo ser encontradas em micro-organismos (TSIVILEVA *et al.*, 2008; BHOWAL *et al.*, 2005), animais (MACIEL CARVALHO *et al.*, 2012; NUNES *et al.*, 2011; SPRONG *et al.*, 2009; PODOLSKY *et al.*, 2006) e plantas (SILVA *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2008; VEGA & PERES, 2006; CORREIA & COELHO, 1995). O reino vegetal se apresenta como uma ótima fonte para purificação destas macromoléculas. A função fisiológica das lectinas tem sido relacionada ao reconhecimento ou ligação de bactérias fixadoras de nitrogênio, como o *Rhizobium*, desempenhando papel no estabelecimento de simbiose (VAN EIJDEN *et al.*, 1995), à proteção da planta contra micro-organismos fitopatogênicos ou predadores, a processos de polinização e podem atuar como proteínas de reserva ou no transporte de glicoconjugados (Ng, 2004; CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; SHARON & GOLDSTEIN, 1998; PEUMANS & VAN DAMME, 1995b).

Dentre as atividades biológicas e aplicações biotecnológicas, destacam-se a identificação de grupos sanguíneos, a caracterização de micro-organismos, a estimulação mitogênica de linfócitos, a aglutinação de células tumorais e a detecção e/ou o isolamento de carboidratos em solução, ligados a macromoléculas ou presentes em superfícies celulares (ARANDA-SOUZA *et al.*, 2014; DE MELO *et al.*, 2011a; MACIEL *et al.*, 2004; SHARON & LIS, 2001; BELTRÃO *et al.*, 1998; LIMA *et al.*, 1997; BEUTH *et al.*, 1995; LIS & SHARON, 1973).

Algumas lectinas demonstram alta toxicidade para insetos, quando adicionadas a uma dieta artificial (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011; HILDER *et al.*, 1995). A lectina purificada a partir de *Opuntia ficus indica* (OfiL) foi capaz de matar operários de *Nasutitermes corniger*, podendo perturbar a organização, estrutura e manutenção de colônias de cupins (PAIVA *et al.*, 2011); esta atividade também foi observada quando a lectina de *Microgramma vacciniifolia* (MvRL) foi utilizada, indicando que o mecanismo da ação termiticida pode incluir suas propriedades de ligação à quitina e atuação como modulador enzimático (ALBUQUERQUE *et al.*, 2012). Já a lectina obtida a partir de sementes de *Moringa oleifera* (WSMoL) apresenta atividade larvicida contra *Aedes aegypti*, além de atuar como um estimulante químico para

oviposição das fêmeas e como agente ovicida (SANTOS *et al.*, 2012); a atividade contra o *A. aegypti* também foi observada com a lectina da folha de *Myracrodruon urundeuva* (MuLL), podendo estar ligada a resistência da lectina à proteólise pelas enzimas das larvas e à interferência na atividade de enzimas digestivas das larvas (NAPOLEÃO *et al.*, 2012). Estes resultados incentivaram nos últimos anos, triagens que avaliem a ação de lectinas como potenciais pesticidas biológicos.

1.1.1 Classificação das Lectinas

1.1.1.1 Classificação de acordo com a especificidade ao carboidrato

Van Damme *et al.* (1998) agruparam as lectinas de acordo com a ligação aos carboidratos, dentre eles destacam-se: fucose, manose, ácido siálico, N-acetilglicosamina, N-acetilgalactosamina/galactose e glicanos complexos.

A especificidade de uma lectina e a confirmação da presença dessas proteínas na amostra são feitas através de ensaios de inibição da atividade hemaglutinante, com diferentes monossacarídeos, oligossacarídeos ou glicoproteínas (SHARON & LIS, 1990).

1.1.2.2 Classificação de acordo com a topologia do sítio ligante

Os sítios de ligação a carboidratos tendem a se dispor na superfície da molécula proteica e a seletividade da ligação é obtida por meio de pontes de hidrogênio, interações de van der Waals e interações hidrofóbicas (ELGAVISH & SHAANAN, 1997; SUROLIA *et al.*, 1996).

Com a finalidade de identificar e agrupar lectinas, elas são classificadas de acordo com a topologia do domínio de reconhecimento de carboidratos. Assim, elas

são divididas em dois grupos, segundo Elgavish & Shaanan (1997). O Grupo I compreende as lectinas de transporte, tais como as proteínas transportadoras periplasmáticas. Nestas lectinas, os sítios de ligação encontram-se mais internos, envolvendo completamente o ligante. Já no Grupo II, estão a maioria das lectinas conhecidas. Ao contrário das lectinas que pertencem ao Grupo I, os sítios de ligação nas do Grupo II são mais externos, ou seja, topologicamente mais rasos, acomodando o carboidrato ligante numa depressão superficial molecular.

1.1.2.3 Classificação de acordo com a estrutura molecular

De acordo com a estrutura molecular e o número dos domínios de ligação, elas podem ser divididas em quatro grandes grupos: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Merolectinas são proteínas de pequeno tamanho e que possuem um único domínio de reconhecimento de carboidratos, sendo incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. Hololectinas são moléculas proteicas com no mínimo dois domínios idênticos ou muito semelhantes que se ligam ao mesmo carboidrato ou a açúcares de estrutura similar. Têm capacidade de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. A maioria das lectinas de plantas pertence a este grupo. Quimerolectinas possuem ao menos dois domínios com atividades diferentes. Um deles é capaz de reconhecer carboidratos e o outro possui uma função distinta, como por exemplo, atividade enzimática. As superlectinas apresentam dois domínios de ligação a carboidratos, de maneira semelhante às hololectinas. Mas, diferentemente destas, as superlectinas são capazes de reconhecer açúcares com estruturas diferenciadas (VAN DAMME *et al.*, 1998).

1.1.3 Purificação e caracterização de Lectinas

Lectinas são encontradas em diversas fontes, mas a purificação destas moléculas ocorre, principalmente, a partir de sementes de leguminosas, nas quais representam até 10% do conteúdo de proteína total (SHARON *et al.*, 2004; KONOZY *et al.*, 2003). A estratégia para o isolamento de lectinas depende da natureza do material biológico, bem como é baseada em algumas características exibidas pelas mesmas, como tamanho molecular, solubilidade, carga e afinidade de ligação a carboidratos, as quais variam de uma proteína para outra (CORREIA & COELHO, 1995).

Existem várias técnicas utilizadas para eliminar moléculas que não sejam de interesse, e envolvem parâmetros como a seleção da solução utilizada para a extração, a temperatura e o tempo. A maioria das lectinas são solúveis em água e em solução salina (MOURE *et al.*, 2001; OSHIKAWA *et al.*, 2000).

O primeiro passo é a preparação de extratos em solução salina ou tampão (MLADENOV *et al.*, 2002). O extrato bruto é avaliado quanto à concentração proteica e à atividade hemaglutinante sendo utilizado como matéria-prima para o isolamento da lectina. Estes extratos são submetidos a purificações parciais por meio de técnicas convencionais para purificação de proteínas, incluindo o fracionamento salino com sulfato de amônio, devido à alta solubilidade deste sal. O fracionamento salino baseia-se no princípio de que a solubilidade da maioria das proteínas diminui na presença de elevadas concentrações de sais. Esse efeito é chamado *salting-out*. Normalmente, os extratos lectínicos passam por este processo para a remoção de toda a camada de solvatação existente ao redor das proteínas, precipitando as mesmas. Após o fracionamento salino, a diálise é realizada para remoção do sal, através de uma membrana de celulose semipermeável (KABIR *et al.*, 1998). Moléculas maiores são retidas dentro da membrana, enquanto que as menores e os íons passam através dos poros da membrana e permanecem na solução.

A utilização de técnicas cromatográficas é muito comum para a purificação de lectinas, sendo que a cromatografia de afinidade é a mais usada devido à

propriedade que elas apresentam de se ligar a carboidratos. As colunas de cromatografia de afinidade são formadas por suportes de polissacarídeos ou de glicoproteínas imobilizadas (COELHO *et al.*, 2012). Outros tipos de cromatografia também podem ser utilizados, tais como a cromatografia de filtração em gel, na qual as moléculas são separadas através do tamanho; a cromatografia de troca iônica, que separa as proteínas de acordo com sua carga - proteínas com carga negativa (aniônicas) ligam-se em coluna contendo o grupo dietilaminoetil (DEAE) que contêm cargas positivas, enquanto que proteínas com cargas positivas (catiônicas) são separadas em colunas contendo o grupo carboximetil (CM), com carga negativa.

Para caracterizar as lectinas são avaliados o pH e a temperatura em que elas apresentam atividade hemaglutinante. É de grande importância conhecer a faixa de pH que estas proteínas se mantêm estáveis, desempenhando suas funções. O pH pode alterar a carga líquida das proteínas, provocando repulsão eletrostática por rompimento de pontes de hidrogênio. Quanto à temperatura, esta pode causar alterações na estrutura tridimensional das lectinas, através do processo de desnaturação (COELHO *et al.*, 2012).

Ainda são utilizados métodos eletroforéticos baseados no princípio que uma molécula com carga elétrica mover-se-á em um campo elétrico, sendo que a velocidade de migração irá depender da intensidade do campo, da carga líquida da proteína e do coeficiente de atrito. As separações eletroforéticas, geralmente, são realizadas em gel de poliacrilamida, porque são quimicamente inertes. A eletroforese em gel de poliacrilamida para proteínas em condições não desnaturantes é utilizada para analisar a pureza de estruturas moleculares nativas. Quando submetidos a condições desnaturantes (presença de dodecil sulfato de sódio) e redutoras (presença de β -mercaptoetanol) revelam o grau de pureza da proteína, a composição de subunidades e através de coloração específica, a natureza glicoproteica (COELHO e SILVA, 2000).

1.1.4 Lectinas de leguminosas

As lectinas de leguminosas são o grupo de lectinas vegetais mais bem estudado e caracterizado (SHARON, 2007). A ConA foi a primeira lectina de leguminosa que teve sua estrutura tridimensional resolvida (BECKER *et al.*, 1975; REEKE *et al.*, 1975; EDELMAN *et al.*, 1972) e, até o momento, é a lectina que foi melhor caracterizada dentre aquelas obtidas a partir de leguminosas (SANZ-APARÍCIO *et al.*, 1997). As lectinas de leguminosas exibem uma grande diversidade na oligomerização dos monômeros em dímeros e tetrâmeros (CHANDRA *et al.*, 2001; SRINIVAS *et al.*, 2001).

Os tetrâmeros de lectinas obtidas de sementes dos gêneros *Cratylia* e *Canavalia* envolvem associações cruzadas de lados posteriores de dois dímeros por alinhamento antiparalelo das folhas beta (DEL SOL *et al.*, 2007). As estruturas quaternárias das lectinas purificadas de plantas da subfamília *Diocleinae* sofrem influência do pH e exibem equilíbrio dímero-tetrâmero dependente de pH, mas, apenas os tetrâmeros são capazes de interagir com receptores na membrana celular induzindo processos de transdução de sinal (CALVETE *et al.*, 1999).

1.1.4.1 *Cratylia mollis*

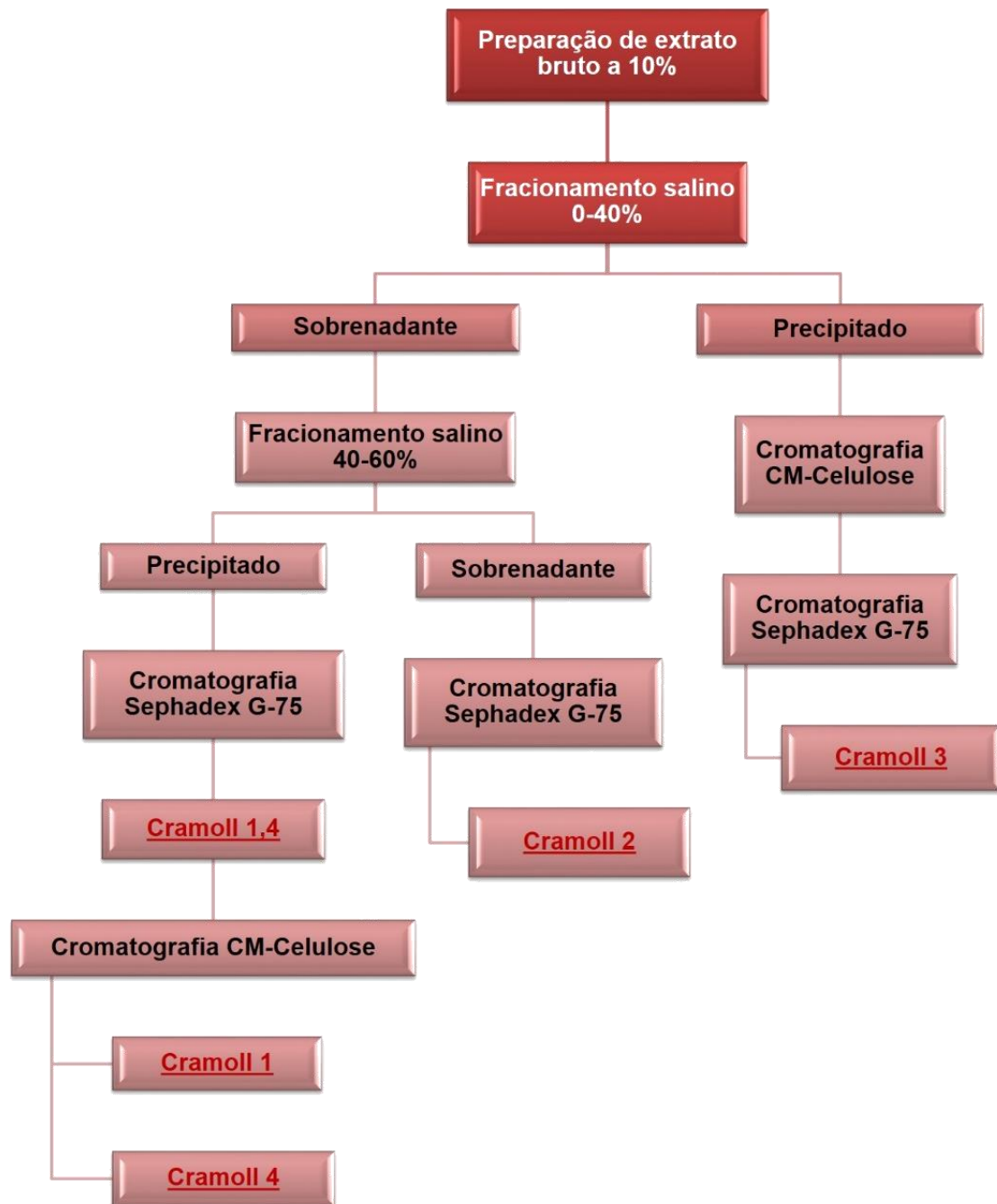
Cratylia mollis é uma espécie pertencente à família Fabaceae, tribo Phaseoleae, subtribo Diocleinae, que também contém o gênero *Canavalia*, botanicamente relacionado à *Cratylia*. Nativa da região semiárida do sertão do Estado de Pernambuco, é popularmente conhecida como feijão camaratuba ou feijão camaratú (Figura 1) e utilizada como forrageira na alimentação de caprinos e bovinos, principalmente nos períodos de estiagem prolongada, quando esta apresenta uma maior importância porque permanece verde. Tem porte arbustivo, produzindo grande quantidade de sementes (ARAÚJO *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2004).

Figura 1: Sementes (A), árvore (B) e flores (C) de *Cratylia mollis*.



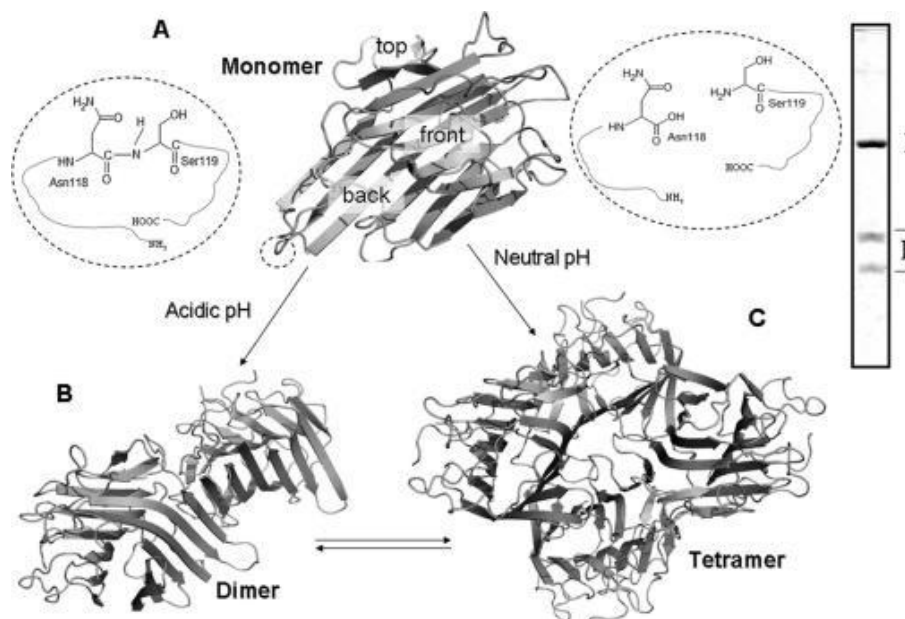
As sementes de *C. mollis* foram avaliadas quanto à presença de lectinas, sendo obtidas isolectinas a partir de diferentes frações de sobrenadante ou precipitados salinos (F0-40% e F40-60%). As isolectinas foram denominadas Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 e Cramoll 4 (Figura 2).

Cramoll 1 é a isolectina mais abundante e foi purificada a partir da F40-60%, da qual também foi obtida, através de cromatografia de afinidade uma preparação purificada, mistura de Cramoll 1 e sua isoforma Cramoll 4 (Cramoll 1,4), que podem ser separadas por cromatografia de troca iônica em coluna de CM-celulose (CORREIA & COELHO, 1995). As isolectinas Cramoll 2 (60 kDa) e Cramoll 3 (31 kDa) foram isoladas a partir do sobrenadante da F40-60% e do precipitado da F0-40%, respectivamente. A classificação das isolectinas foi feita de acordo com a migração eletroforética em gel para proteínas básicas nativas; Cramoll 1 apresenta a maior migração (proteína mais básica) (pH 8.5-8.6), seguida de Cramoll 2 (pH 4.15-6.7) e por fim, Cramoll 3 (pH 5.25-5.8) (PAIVA & COELHO, 1992).

Figura 2: Principais etapas para purificação das isoformas de lectinas de *Cratylia mollis*

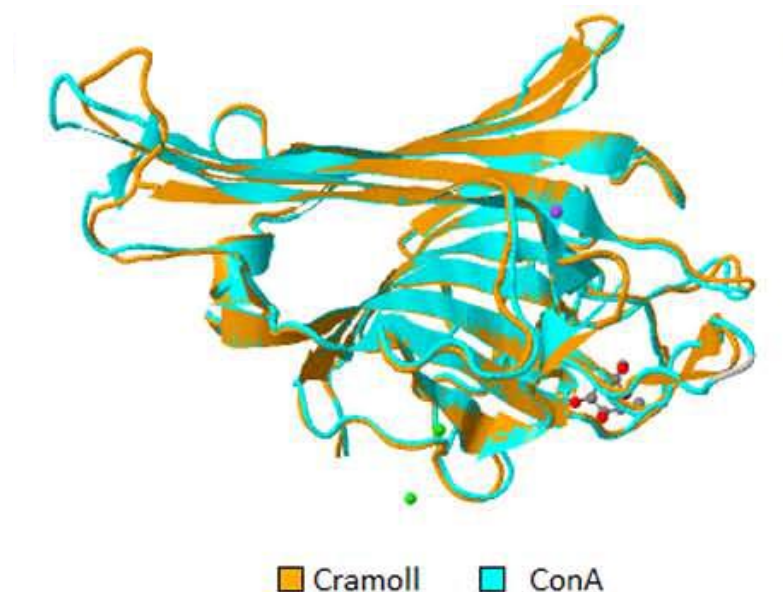
A estrutura terciária de Cramoll 1 foi determinada através de cristalografia de raios X e revelou três folhas β conectadas por *loops*, conhecidos como domínios *jellyroll* (quase idênticos aos domínios da ConA) (Figura 3) (VAREJÃO *et al.*, 2010).

Figura 3: Estrutura terciária de Cramoll 1(A), Dimerização envolvendo alinhamento antiparalelo de folhas beta (B) e tetramerização consistindo da associação de dois dímeros (C). Fonte: VAREJÃO *et al.*, 2010.



Quanto à especificidade por carboidratos, Cramoll 1,4, Cramoll 1 e Cramoll 2 pertencem à classe das lectinas que se ligam à glicose/manose, enquanto que Cramoll 3 é uma glicoproteína específica para galactose. A topologia de Cramoll 1,4 é quase idêntica à da ConA (Figura 4) (DA SILVA *et al.*, 2014). Tanto Cramoll quanto ConA apresentam sítios de ligação para os íons Mn^{+2} e Ca^{+2} (SOUZA *et al.*, 2003).

Figura 4: Similaridade de estrutura entre as lectinas Cramoll e ConA. Fonte: DA SILVA *et al.*, 2014.



A purificação de proteínas exige tempo e grande volume de material biológico, além de que pode haver um baixo rendimento e contaminação das frações purificadas. Objetivando solucionar esses problemas, surgiu o processo de expressão heteróloga, o qual exhibe uma produção mais efetiva de proteínas e com um maior grau de pureza (GEMEINER *et al.*, 2009).

Já foi relatada a expressão e a purificação da Cramoll 1 recombinante (rCramoll) em *Escherichia coli*, o que foi conseguido através da introdução de um DNA sintetizado quimicamente capaz de codificar a sequência de aminoácidos de Cramoll 1 dentro de um vetor de expressão de origem bacteriana, sob o controle do promotor de T7. Grande parte da lectina recombinante foi encontrada em agregados insolúveis, também chamados de corpos de inclusão, mas através da diminuição da temperatura de indução de proteínas, foi possível recuperar quantidades razoáveis da lectina solúvel na sua forma ativa. A lectina recombinante foi purificada até a homogeneidade através de cromatografia de afinidade. A Cramoll 1 nativa (pCramoll) e a Cramoll recombinante (rCramoll) apresentam propriedades físico-químicas, tais como peso molecular, densidade de carga e estruturas secundária e terciária semelhantes. No entanto, pCramoll possui menor estabilidade termodinâmica quando comparada com a rCramoll. Esta característica, provavelmente, é causada pela presença de tetrâmeros compostos de monômeros fragmentados, que são formados nos cotilédones da planta, mas ausentes na proteína recombinante. rCramoll também partilha com a pCramoll outras particularidades, como a especificidade por monossacarídeos, bem como suas atividades aglutinantes em eritrócitos de coelho (VAREJÃO *et al.*, 2010).

Cramoll 1,4 pode ser utilizada para o isolamento e caracterização de moléculas bioativas. Quando imobilizada em Sepharose 4B (Cra-Sepharose) foi capaz de isolar a enzima lecitina colesterol aciltransferase, além de outras glicoproteínas do plasma humano (LIMA *et al.*, 1997). Este mesmo sistema foi usado para isolar proteína de sementes de *Glycine max* com atividades de anticoagulação e antiagregação plaquetária *in vitro* (SILVA *et al.*, 2011). Napoleão *et al.* (2013) isolaram glicoproteínas provenientes de soro fetal bovino, colostro humano, ovo de galinha e plasma humano a partir de matrizes contendo lectinas de *C. mollis* imobilizadas (Cramoll 1,2,3-Sepharose e Cramoll 3-Sepharose).

Cramoll 1,4 é descrita como agente cicatricial, pois promove maior migração de células polimorfonucleares, aumento de tecido de granulação e de deposição de fibras de colágeno em feridas experimentais (DE MELO *et al.*, 2011b). Além disso, grupos de ratos *Wistar* tratados com hidrogel de Cramoll 1,4 após indução de queimaduras de segundo grau mostraram proliferação fibroblástica intensa e presença de colágeno denso (PEREIRA *et al.*, 2012).

A primeira indicação que Cramoll 1,4 tem propriedade imunomodulatória foi devido a sua capacidade de induzir efeito mitogênico em linfócitos T, de maneira semelhante à ConA (MACIEL *et al.*, 2004). A atividade mitogênica também foi demonstrada em linfócitos esplênicos de camundongos BALB/c inoculados por dois dias com uma dose única intraperitoneal na concentração de 100 µg/mL de Cramoll 1,4. Este trabalho mostrou que Cramoll 1,4 foi capaz de estimular quantidades significativas de células na fase S do ciclo celular e altos níveis de IL-2, IL-6 e IFN-γ, bem como produção de óxido nítrico (DE MELO *et al.*, 2011a). Em uma pesquisa semelhante, os camundongos BALB/c foram inoculados com uma dose única intraperitoneal na concentração de 235 µg/mL de Cramoll 1,4 e a análise dos esplenócitos após sete dias mostrou uma produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (EROs) citosólicas e mitocondriais, bem como aumento dos níveis de cálcio (DE MELO *et al.*, 2010a). Cramoll 1,4 induz a resposta Th1, através da produção de IFN-γ e mostra atividade anti-inflamatória pela supressão de óxido nítrico em linfócitos experimentais (DE MELO *et al.*, 2010b). É capaz de gerar memória imunológica através da indução de IL-6, IL-17A, IL-22 e IL-23 por linfócitos de camundongos BALB/c ou por células mononucleares do sangue periférico de humanos (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Cramoll 1,4 apresentou potencial atividade anti-helmíntica quando testada contra a infecção por *Schistosoma mansoni* em camundongos *Swiss* infectados subcutaneamente. Dois esquemas de tratamento foram realizados: uma dose única na concentração de 50 mg/kg após 40 dias de infecção ou uma dose diária na concentração de 7 mg/kg durante 7 dias após a infecção. Ambos os tratamentos foram eficientes na redução da oviposição ou dos granulomas no fígado (DE MELO *et al.*, 2011c). Cramoll 1,4 causou a morte de *Trypanosoma cruzi* por necrose e esta morte está associada à permeabilização da membrana mitocondrial, possibilitando a entrada de íons Ca^{2+} e seu acúmulo na mitocôndria, aumentando os

níveis de EROs (FERNANDES *et al.*, 2010). Estudo comparando o tratamento com Cramoll 1,4 em mitocôndrias isoladas a partir de *T. cruzi* e mitocôndrias isoladas de fígado de rato revelou que a lectina é capaz de causar aumento nos níveis de EROs em ambas, caracterizando, desta maneira, o estresse oxidativo. Este aumento está diretamente relacionado à abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM), sendo que a transição de permeabilidade mitocondrial (TPM) pode ser inibida por Ciclosporina A (CsA) apenas na mitocôndria de fígado de rato (FERNANDES *et al.*, 2014).

A atividade antitumoral de Cramoll 1,4 encapsulada em lipossomos foi testada contra Sarcoma 180 de camundongos *Swiss*, demonstrando que o encapsulamento melhora sua atividade antitumoral e diminui a toxicidade tecidual, particularmente no fígado e nos rins (ANDRADE *et al.*, 2004). Cramoll 1,4 possui forte capacidade de ligação a células transformadas originadas de tecidos mamários, uterinos e cerebrais (BELTRÃO *et al.*, 1998). É capaz de reconhecer carboidratos alterados na membrana de células prostáticas, sendo boa candidata a sonda histoquímica para patologias de próstata (DE LIMA *et al.*, 2010).

1.1.5 Lectinas e morte celular

O interesse pelo estudo das lectinas aumentou a partir de 1960, após a verificação de que a PHA estimula linfócitos, resultando em divisão mitótica, e que a aglutinina de *Triticum vulgaris* (WGA), do gérmen de trigo, é capaz de aglutinar mais intensamente células transformadas do que normais (SHARON & LIS, 1987). Após a descoberta de INBAR & SACHS (1969), de que a ConA também aglutinava preferencialmente células malignas, é que houve um impulso na pesquisa das atividades biológicas e aplicações de lectinas. Algumas lectinas já foram utilizadas como ferramentas para diferenciar tumores malignos de tumores benignos, bem como o grau de glicosilação associado a metástases (MODY *et al.*, 1995); e, nos últimos anos têm sido desenvolvidos microarranjos que permitem reconhecer melhor tumores malignos nos diagnóstico e prognóstico do câncer (GUPTA *et al.*, 2010).

O estudo com lectinas exerce um papel importante na terapia contra o câncer, pois algumas delas inibem o crescimento das células tumorais. Os mecanismos de ação destas proteínas variam desde a origem celular até a concentração da lectina analisada. O efeito citotóxico de muitas lectinas resulta em processos de morte celular, por apoptose, necrose e/ou autofagia, que podem ter ou não a participação da mitocôndria (GIANSAINTI *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2009).

Estudos recentes mostram que a ConA exerce um potente efeito indutor de morte celular, pois se liga a glicoproteínas da membrana celular, é internalizada e causa morte celular por acúmulo na mitocôndria, levando a um colapso do potencial de membrana, liberação do citocromo *c* e ativação de caspases (LI *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2009a; LIU *et al.*, 2009b; LEI & CHANG, 2007). GASTMAN *et al.* (2004) demonstraram que a WGA promove apoptose em células JURKAT através de uma via mitocondrial com ativação de caspase-9. A lectina VCA (aglutinina de *Viscum album* L. *coloratum*) induziu apoptose por ativação de caspase-3 em células de leucemia mielocítica humana (HL-60) (LYU *et al.*, 2001). Além disso, outra lectina de *Viscum album*, a ML-1, ativa caspase-8 independentemente de receptor de morte e promove apoptose por liberação de citocromo *c* (BANTEL *et al.*, 1999). A lectina purificada a partir do veneno de *Bothrops leucurus* (BIL) mata preferencialmente células de melanoma B16-F10 do que células não transformadas da linhagem HaCaT. BIL é capaz de causar necrose em células B16-F10 através do aumento de EROs e da concentração de íons cálcio citosólico, com envolvimento da mitocôndria, causando sobrecarga de íons cálcio na mitocôndria e abertura do PTPM (ARANDA-SOUZA *et al.*, 2014).

Portanto, lectinas são promissores candidatos a fármacos antitumorais e, algumas delas têm sido analisadas em terapias pré-clínicas e clínicas (FU *et al.*, 2011; GUPTA *et al.*, 2010).

1.2 CÂNCER

O equilíbrio entre os mecanismos de divisão e de morte celular é responsável pela homeostase, pela integridade e pela função tecidual. Este equilíbrio é mantido através de um complexo sistema de sinalização intracelular e extracelular. Dependendo da necessidade do tecido, as células podem se multiplicar a uma taxa elevada, em um processo conhecido como hiperplasia, o qual é cessado após o término do estímulo que o provocou. Entretanto, quando ocorre um descontrole em uma única célula e, esta é capaz de sofrer alterações genéticas que lhe permitam sobreviver e se multiplicar, produzindo células-filhas também anômalas, ocorre a formação de uma grande quantidade de células desordenadas, a qual constitui um tumor primário (INCA, 2014; KUMAR, 2010).

A neoplasia ou, mais popularmente, o câncer, refere-se a uma doença genética que pode ocorrer em todos os tipos de tecido do organismo, sendo consequente a uma alteração na informação contida no material genético. Essas mutações são capazes de modificar a expressão de genes codificadores de proteínas comprometidos com o controle da proliferação e da diferenciação celular ou, ainda, envolvidos nos mecanismos de reparo do ácido desoxirribonucleico (DNA). Em decorrência, as células anormais proliferam de maneira mais rápida que as células normais, sendo capazes de invadir tecidos circunvizinhos, levando à metástase. Estas alterações no material genético podem ser desencadeadas por fatores externos ou internos. Fatores externos compreendem dieta, radiação ionizante, agentes químicos e físicos e alguns micro-organismos. Estes agentes, conhecidos como carcinógenos, desempenham um papel importante nas alterações genéticas causadoras de câncer. Já as causas internas são, na maior parte das vezes, geneticamente pré-determinadas e estão associadas à capacidade que o organismo tem de se proteger das agressões externas (INCA, 2014; KLUG *et al.*, 2012).

As doenças não transmissíveis (DNT), tais como doenças cardiovasculares, câncer, diabetes e doenças pulmonares crônicas são as principais causas de morte em todas as regiões do mundo, exceto na África subsaariana. Quatro fatores de risco comportamentais são os responsáveis pela maioria das DNT: uso do tabaco,

dieta incorreta, atividade física insuficiente, e uso nocivo do álcool (PRB, 2012). A predisposição genética também é um fator de risco, proporcionando 20% de casos de câncer. Assim, a maioria dos cânceres são associados à carcinogênese ambiental (REDDY *et al.*, 2003).

Em 2012, de um total de aproximadamente 56 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 8,2 milhões, o que representou cerca de 14% de todas as mortes. Estima-se que, no ano 2030, ocorram 21,4 milhões de casos incidentes de câncer, 13,2 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer (WHO, 2013; PRB, 2012).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2014, válidas também para o ano de 2015, apontaram a ocorrência de aproximadamente 576 mil novos casos de câncer, incluindo os de pele não-melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Com exceção do câncer de pele não-melanoma, estima-se um total de 394 mil novos casos, 204 mil para o sexo masculino e 190 mil para sexo feminino. Os tipos mais incidentes são os cânceres de pele não-melanoma (182 mil novos casos), de próstata (69 mil), de mama feminina (57 mil), de cólon e reto (33 mil), de pulmão (27 mil), de estômago (20 mil) e de colo do útero (15 mil). Em homens, os mais predominantes são os cânceres de próstata, de pulmão, de cólon e reto, de estômago e de cavidade oral; e, nas mulheres, os de mama, de cólon e reto, de colo do útero, de pulmão e de glândula tireoide (INCA, 2014).

Grande parte das mutações que acontecem no material genético é somática, ocorrendo nas células do corpo já desenvolvido e não são passadas para as gerações futuras através das células germinativas; mas, em uma pequena porcentagem, as mutações ocorrem nos genes da linhagem germinativa e são transmitidas à progênie, causando susceptibilidade ao câncer (KLUG *et al.*, 2012). Por isso, alguns indivíduos herdam mutações em sua linhagem germinativa em genes supressores de tumor ou em oncogenes, os quais são formas ativas dos proto-oncogenes que estão presentes em células normais na forma inativa e são responsáveis por produzir proteínas que regulam a divisão e a adesão celular. Proto-oncogenes são genes normais capazes de codificar proteínas que ajudam a regular o crescimento e a diferenciação celular, porém tornam-se um oncogene devido a uma mutação ou ao aumento de expressão gênica; de forma semelhante, a mutação

de genes supressores de tumor podem retardar a inibição da progressão do ciclo celular, facilitando o crescimento anormal. Apesar dos avanços no estudo, ao longo dos anos, a respeito da genética do câncer, os mecanismos pelos quais as mutações, a perda de genes supressores e como as alterações genéticas ocorrem não são conhecidos. Algumas pessoas, provavelmente, possuem uma predisposição a quebras na molécula do DNA e à incapacidade de reparar erros (FOSTER, 2008; WEINBERG, 2008; VERMEULEN *et al.*, 2003).

As células cancerosas atuam diferentemente das células normais: possuem origem clonal, autonomia e capacidade de metástase, ou seja, algumas células do tumor primário perdem a capacidade de adesão, invadem a membrana basal do tecido de origem através da produção de enzimas proteolíticas, atravessam a parede dos vasos sanguíneos, caem na circulação e formam áreas de proliferação em outros tecidos. Células tumorais podem viver de forma independente em cultura *in vitro*, as quais tendem a crescer de forma desorganizada, umas sobre as outras, ao contrário das células normais, que exibem inibição por contato (KUMAR, 2010). A transformação maligna refere-se ao processo pelo qual uma célula normal é convertida em outra célula que exhibe as características mencionadas acima (KUMAR, 2010) e pode ser estudada observando-se as modificações no glicocálix e a perda de junções celulares (BROOKS & CARTER, 2001).

Os agentes antitumorais incluem vários compostos que atuam interferindo nos mecanismos de sobrevivência, de proliferação e de migração celular. Os agentes atualmente disponíveis manifestam toxicidade significativa sobre os tecidos normais como maior complicação do seu uso, devendo-se considerar criteriosamente o risco/benefício destes medicamentos. As drogas antitumorais devem entrar na célula para produzir os efeitos citotóxicos desejados, porém devem apresentar baixa citotoxicidade em células normais (REDDY *et al.*, 2003).

1.2.1 Câncer de Próstata

Estima-se que 1,1 milhão de homens em todo o mundo foram diagnosticados com câncer de próstata em 2012, respondendo por 15% dos casos de câncer diagnosticados em homens, com quase 70% dos casos (759 mil) ocorrendo em regiões mais desenvolvidas. A incidência do câncer de próstata varia mais de 25 vezes em todo o mundo; com taxas mais elevadas na Austrália/Nova Zelândia (111,6/100 mil habitantes) e América do Norte (97,2/100 mil habitantes), e na Europa Ocidental e do Norte. Esse número elevado pode ocorrer, provavelmente, como um reflexo das práticas de rastreamento pela dosagem do antígeno prostático específico (PSA) (INCA, 2014).

No Brasil, o câncer de próstata representa o segundo tipo mais comum de tumor maligno, atrás apenas do câncer de pele não-melanoma; também é o sexto tipo mais frequente no mundo, representando 10% do número total de casos de câncer. É considerada uma doença da terceira idade, visto que cerca de 65% dos casos acometem homens com 65 anos ou mais. No ano de 2012, o número de mortes chegou a 13.354, enquanto que a estimativa de novos casos em 2014, também válida para o ano de 2015, foi de 68.800 (Figura 5 e Figura 6), sendo o mais incidente em todas as regiões do país. O aumento da expectativa de vida, a melhoria e a evolução dos métodos diagnósticos e da qualidade dos sistemas de informação do Brasil, bem como a ocorrência de diagnóstico em função da disseminação do rastreamento do câncer de próstata com PSA e toque retal, podem explicar o aumento das taxas de incidência ao longo dos anos (INCA, 2014).

Figura 5: Estimativas do ano de 2014, no Brasil, das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, segundo o sexo e a localização primária*. Fonte: INCA, 2014.

Localização Primária da Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estado		Capitais		Estado		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	68.800	70,42	17.540	82,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.120	56,09	19.170	80,67
Colo do Útero	-	-	-	-	15.590	15,33	4.530	19,20
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	16,79	4.000	18,93	10.930	10,75	3.080	13,06
Cólon e Reto	15.070	15,44	4.860	22,91	17.530	17,24	5.650	23,82
Estômago	12.870	13,19	2.770	13,07	7.520	7,41	2.010	8,44
Cavidade Oral	11.280	11,54	2.220	10,40	4.010	3,92	1.050	4,32
Laringe	6.870	7,03	1.460	6,99	770	0,75	370	1,26
Bexiga	6.750	6,89	1.910	8,91	2.190	2,15	730	2,97
Esôfago	8.010	8,18	1.460	6,76	2.770	2,70	540	0,00
Ovário	-	-	-	-	5.680	5,58	2.270	9,62
Linfoma de Hodgkin	1.300	1,28	410	5,72	880	0,83	420	8,64
Linfoma não Hodgkin	4.940	5,04	1.490	6,87	4.850	4,77	1.680	7,06
Glândula Tireoide	1.150	1,15	470	1,76	8.050	7,91	2.160	9,08
Sistema Nervoso Central	4.960	5,07	1.240	5,81	4.130	4,05	1.370	5,81
Leucemias	5.050	5,20	1.250	5,78	4.320	4,24	1.250	5,15
Corpo do Útero	-	-	-	-	5.900	5,79	2.690	11,24
Pele Melanoma	2.960	3,03	950	4,33	2.930	2,85	1.150	4,57
Outras Localizações	37.520	38,40	9.070	42,86	35.350	34,73	8.590	36,49
Subtotal	203.930	208,77	51.100	241,30	190.520	187,13	58.710	248,46
Pele não Melanoma	98.420	100,75	19.650	92,72	83.710	82,24	22.540	95,26
Todas as Neoplasias	302.350	309,53	70.750	334,08	274.230	269,35	81.250	343,85

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Figura 6: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes, no Brasil, em 2014 por sexo, exceto pele não melanoma*. Fonte: INCA, 2014.

Localização primária	casos	%	Homens	Mulheres	Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%			Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

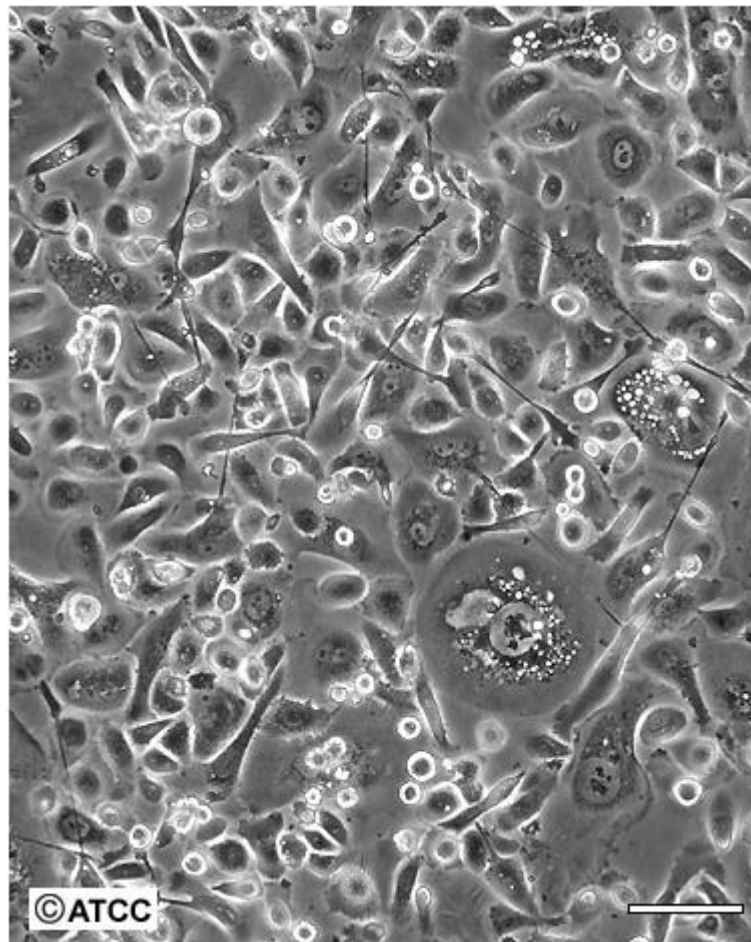
*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Quando o tumor está localizado apenas no órgão de origem, ele pode ser removido por cirurgia ou por radiação. Alguns dos tumores de próstata podem crescer rapidamente, espalhando-se por outros órgãos. Assim, quando ocorrem metástases, a doença torna-se quase incurável (AMANATULLAH *et al.*, 2000). Porém, a maioria deles cresce de forma bastante lenta, demorando cerca de 15 anos para atingir 1 cm³, não ameaçando a saúde do homem durante este período (INCA, 2014).

Após o trabalho de Charles Huggins, a terapia de restrição de andrógeno tornou-se o tratamento mais utilizado para o câncer de próstata em estágio avançado (DENMEADE & ISAACS, 2002). Infelizmente, esse tipo de tratamento não elimina totalmente as células tumorais e depois de um período, que pode variar entre 9 e 30 meses, ocorre a seleção e a proliferação de células independentes de andrógeno (LAUFER *et al.*, 2000). Portanto, medicamentos que induzem morte das células de câncer de próstata podem constituir uma alternativa para o controle desse tipo de tumor.

As linhagens de células humanas de câncer de próstata mais utilizadas para estudos *in vitro* são: LNCaP, PC-3 e DU 145 (PEEHL, 2005). Nesse trabalho foram utilizadas células PC-3 (Figura 7), que constituem uma linhagem considerada independente de andrógeno. Estas células foram obtidas do osso de um homem caucasiano de 62 anos com diagnóstico de metástase de adenocarcinoma de próstata em estágio IV (KAIGHN *et al.*, 1979).

Figura 7: Linhagem celular de câncer de próstata. Foto de cultura de células PC-3, obtida do site da ATCC (American Type Culture Collection). Escala da barra = 100 μ m.



1.3 MITOCÔNDRIA

1.3.1 Bioenergética mitocondrial

As mitocôndrias são as organelas responsáveis pela conversão de energia de óxido-redução em energia química utilizada pelos eventos celulares. Além disso, elas têm emergido como uma organela central nos processos de sinalização, de injúria e de morte celular (INADA *et al.*, 2008). Mitocôndrias estão presentes na maioria das células eucarióticas animais e vegetais, tendo dimensões da ordem de grandeza de 1 μ m.

Entre os primeiros pesquisadores que relataram a existência das mitocôndrias como organelas citoplasmáticas, destaca-se o cientista Kölliker, o qual observou que existiam grânulos bem organizados no sarcoplasma de músculos esqueléticos. Em meados de 1890, estes grânulos foram denominados sarcossomos, pelo cientista Retzius (LEHNINGER, 1964). A partir daí, Bensley, em 1930, tentou isolar mitocôndrias provenientes de células do tecido hepático, através de centrifugação diferencial. Ele não obteve sucesso no isolamento de organelas intactas, mas seu trabalho tem um enorme destaque por reunir pesquisas bioquímicas de respiração mitocondrial. O isolamento de mitocôndrias intactas foi realizado, pela primeira vez, em 1948, por Hogeboom, Schneider e Palade. Em 1949, os cientistas Eugene Kennedy e Albert Lehninger isolaram mitocôndrias de fígado, demonstrando que ela é a responsável pela síntese de adenosina trifosfato (ATP), associada a oxidação de coenzimas (NELSON & COX, 2014).

Estruturalmente, são constituídas por duas membranas e dois compartimentos limitados por estas membranas. O compartimento mais interno, delimitado pela membrana mitocondrial interna, é denominado de matriz mitocondrial e contém enzimas presentes em reações do ciclo de Krebs, da β -oxidação de ácidos graxos e da oxidação de aminoácidos. O segundo compartimento é denominado espaço intermembranar, pois localiza-se entre as membranas interna e externa (VERCESI, 2003).

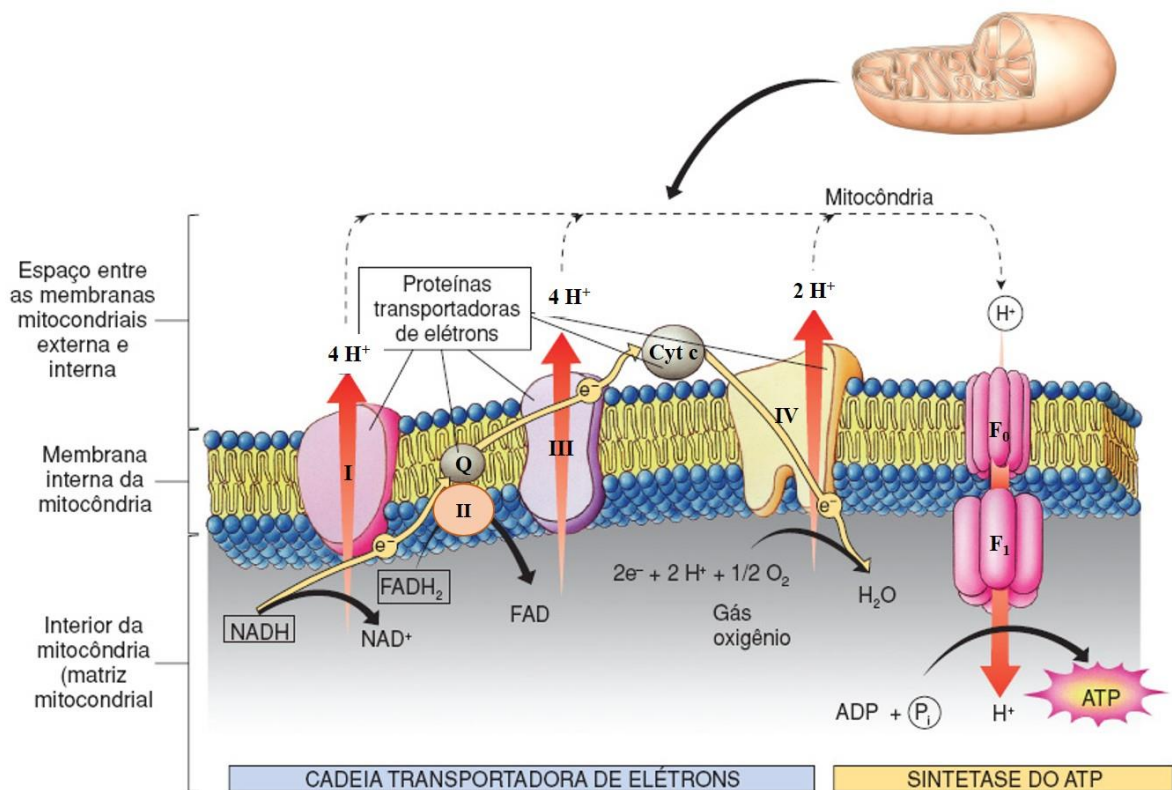
A membrana mitocondrial externa é permeável a pequenas moléculas e íons que se movem livremente através de canais transmembranas formados por uma família de proteínas integrais de membranas denominadas porinas. A membrana interna é impermeável a maioria das pequenas moléculas e de íons, incluindo prótons (H^+), sendo permeável somente a O_2 , CO_2 , NO e H_2O . As únicas moléculas capazes de atravessar a membrana mitocondrial interna são aquelas para as quais existem transportadores específicos, como por exemplo, ATP^{4-} , ADP^{3-} , piruvato e Ca^{2+} (NELSON & COX, 2014).

Na membrana mitocondrial interna encontram-se os componentes da cadeia respiratória e a ATP sintase (NICHOLLS & FERGUSON, 2002). A energia necessária para o processo de fosforilação oxidativa provém da diferença de potencial de óxido-redução entre $NADH$ ou $FADH_2$ e O_2 . Segundo Peter Mitchell

(1961), a passagem dos elétrons retirados dos substratos respiratórios pela cadeia respiratória é um processo exergônico cuja energia livre resultante é convertida em um potencial eletroquímico de H^+ através da membrana mitocondrial interna. Esta energia é utilizada pela ATP sintase para fosforilar ADP à ATP. Normalmente, elétrons provenientes das coenzimas NADH, reduzidas durante a oxidação de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos, são transferidos à NADH desidrogenase, conhecida como complexo I. O complexo I transfere seus elétrons à forma oxidada da coenzima Q (UQ), gerando a forma reduzida, UQH_2 . Os elétrons que são originados do succinato passam para a UQ através do complexo II, resultando na redução da coenzima Q. Esta coenzima também pode ser reduzida pela glicerol-3-fosfato desidrogenase, na presença de glicerol-3-fosfato citosólico, ou pela ubiquinona oxiredutase, como resultado da β -oxidação de ácidos graxos. A forma reduzida é desprotonada, originando a espécie aniônica semiquinona ($UQH^\cdot$), responsável por doar elétrons ao citocromo c, o qual transfere elétrons à enzima citocromo c oxidase, conhecida como complexo IV da cadeia respiratória. A citocromo c oxidase é responsável pela transferência de elétrons ao oxigênio molecular, culminando com a geração de água, em um processo envolvendo quatro passos consecutivos de transferência de um elétron (NICHOLLS & FERGUSON, 2002).

De acordo com Peter Mitchell (1961), a passagem de elétrons através da sequência de intermediários redox da cadeia respiratória permite um fluxo de H^+ da matriz mitocondrial ao espaço intermembranas, contra um gradiente de concentração e a formação deste potencial eletroquímico entre as membranas é o ponto de partida do acoplamento entre a oxidação de substratos e a utilização da energia obtida com a transferência dos elétrons. O componente elétrico ($\Delta\Psi$) atinge valores de aproximadamente 180 mV, no estado de repouso, enquanto o componente químico (ΔpH) oscila entre 0 a 1 unidade de pH. O fluxo de H^+ através da ATP sintase, de volta ao interior da mitocôndria, desta vez a favor do gradiente de concentração, está relacionado à produção de ATP a partir da fosforilação do ADP. A ATP sintase é constituída por duas subunidades distintas, F_1 – solúvel e localizada na matriz mitocondrial; e F_o – hidrofóbica e mergulhada na membrana mitocondrial interna, na qual também estão localizados os outros complexos da cadeia respiratória (Figura 8).

Figura 8: Esquema simplificado da cadeia respiratória e da teoria quimiosmótica aplicada à mitocôndria. Fonte: <https://thinkbio.wordpress.com/2011/12/31/processos-energeticos-celulares/>



1.3.2 Geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Normalmente, durante o metabolismo celular aeróbio, são produzidas substâncias eletricamente instáveis, denominadas radicais livres, que atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções importantes no metabolismo. Estão envolvidas na produção de energia, na fagocitose, na regulação do crescimento celular, na sinalização celular e na síntese de substâncias biológicas importantes. Entretanto, podem reagir com biomoléculas, tais como DNA ou proteínas, gerando novos radicais livres além de espécies reativas não-radicalares, as quais causam danos irreparáveis nas células (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

A passagem de elétrons através da cadeia respiratória tem como consequência a geração de EROs. Aproximadamente 2% dos elétrons que entram na cadeia respiratória não são utilizados para reduzir O_2 à H_2O . Esses elétrons são capazes de se combinar com o oxigênio em passos intermediários da cadeia respiratória, promovendo a redução do O_2 e gerando o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), principalmente nos complexos I e III (BOVERIS & CHANCE, 1973; LIU, 1997). A produção de $O_2^{\cdot-}$ pelo complexo I é promovida pelos substratos dependentes de NAD como α -cetoglutarato, malato, glutamato e piruvato, além de ser estimulada por rotenona, um inibidor da transferência de elétrons do complexo I à coenzima Q (KOWALTOWSKI *et al.*, 2009). Os ânions $O_2^{\cdot-}$ são, posteriormente, convertidos em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (KATOCH & BEGUM, 2003).

Como a geração mitocondrial de $O_2^{\cdot-}$ é um processo contínuo e fisiológico, a mitocôndria apresenta alguns sistemas antioxidantes, tais como enzimas tiólicas, superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD), glutathione, NADPH, vitaminas E e C. Além desses sistemas, a mitocôndria também tem mecanismos que promovem um pequeno desacoplamento da fosforilação oxidativa, o que pode diminuir a geração de EROs (SKULACHEV, 1991). Entre os desacopladores encontram-se as proteínas desacopladoras (UCPs) e o translocador de nucleotídeos de adenina (ANT). Eles são capazes de promover uma pequena diminuição do potencial eletroquímico de H^+ , que é suficiente para aumentar o consumo de O_2 e mudar o estado de óxido-redução dos transportadores de elétrons da cadeia respiratória (KLINGENBERG *et al.*, 2001; SAMARTSEV *et al.*, 1997).

Em processos fisiológicos normais, as espécies reativas interferem em vias de sinalização intracelular relacionadas com apoptose e processos inflamatórios. São mediadoras de morte celular, pois altos níveis de estresse oxidativo podem causar necrose enquanto que baixos níveis podem desencadear a apoptose, processo importante em mecanismos fisiológicos (DYPBUKT *et al.*, 1994). Participam ainda da defesa celular, através da destruição de micro-organismos durante a fagocitose. Porém, esse processo passa a ser prejudicial quando a inflamação se torna sistêmica, como na sepse, em que a perda de controle da produção de EROs pode causar lesão a distância. Além disso, nas doenças inflamatórias crônicas esta produção torna-se excessiva, provocando lesões teciduais (LEITE & SARNI, 2003).

As principais espécies reativas de oxigênio formadas são o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila ($OH^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (LEITE & SARNI, 2003; ANDERSON, 1996). Tanto o H_2O_2 quanto o $O_2^{\cdot-}$ são extremamente tóxicos, pois causam lesões ao se unirem aos ácidos graxos das membranas celulares. Esta toxicidade deve-se à capacidade destes radicais transformarem-se em $OH^{\cdot-}$, o que caracteriza a reação de Fenton. A $OH^{\cdot-}$ é um radical lesivo, porque causa quebras e modificações nas bases do DNA, alterações de cadeias proteicas e peroxidação lipídica. Ainda podem inativar várias proteínas ao oxidar os grupamentos sulfidrilas ($-SH$) a pontes dissulfeto ($-SS$) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

1.3.3 Homeostase de Cálcio

O cálcio (Ca^{2+}) exerce importantes papéis como segundo mensageiro no controle de muitos processos biológicos, tais como, crescimento, diferenciação, motilidade, contração, endocitose, exocitose, regulação do metabolismo intermediário, expressão de genes e apoptose (MORENO *et al.*, 1994). Vários aspectos envolvem a complexa relação existente entre os íons Ca^{2+} e a sinalização da morte celular. O Ca^{2+} é responsável por regular inúmeros passos que caracterizam mecanismos de iniciação de morte celular, efeitos de morte celular e reconhecimento desta por macrófagos (BERRIDGE *et al.*, 2000).

A captação e a liberação do Ca^{2+} através da membrana plasmática e das organelas intracelulares ocorre através da ação conjunta de sistemas de transporte responsáveis pelo controle da concentração de Ca^{2+} intracelular (MORENO *et al.*, 2003). Três famílias de canais estão envolvidas na entrada de cálcio na célula. São eles: canais voltagem dependentes (VDAC), ativados por despolarização da membrana; canais operados por receptores, modulados pela ligação agonista/antagonista; e canais capacitativos, operados por estoques que se abrem em resposta a redução na concentração de Ca^{2+} intracelular mediada pela participação do retículo endoplasmático (PUTNEY & BIRD, 1994).

Para que uma célula funcione normalmente, a concentração de Ca^{2+} intracelular deve ser mantida a níveis baixos em relação ao meio externo. Em

mamíferos, a concentração de Ca^{2+} citosólico, em condições de repouso, é mantida na ordem de $0,1 \mu\text{M}$, bem menor que a concentração do Ca^{2+} extracelular, que é em torno de 1 mM (MARIN *et al.*, 1998; NICOTERA & ORRENIUS, 1998; NICOTERA *et al.*, 1992). Esta grande diferença de concentração de íons Ca^{2+} entre os compartimentos intra e extracelulares possibilita a transdução de sinais bioquímicos no interior das células. A distribuição do Ca^{2+} intracelular é controlada por processos de transporte através da membrana plasmática e das membranas de organelas, como o retículo endoplasmático, o núcleo e a mitocôndria (CARMELIET, 2004; GUNTER & GUNTER, 1994).

A mitocôndria tem um papel fundamental na sinalização exercida pelo cálcio. Por um lado, são maquinarias complexas para manipulação destes íons através de rotas eletroforéticas de acúmulo de cálcio na matriz abaixo do gradiente eletroquímico (através de canais uniporter mitocondriais de cálcio - MCU) e trocadores de Ca^{2+} por Na^{2+} ou H^{+} . Por outro lado, o efeito do cálcio dentro da mitocôndria pode estimular desidrogenases e mudanças nucleares e lisossomais, por exemplo, culminando na morte celular por apoptose ou necrose (RIZZUTO *et al.*, 2003).

A versatilidade dos íons Ca^{2+} é importante não apenas em condições de normalidade, mas também em processos celulares patológicos. Privar as células de íons Ca^{2+} (através da remoção do cálcio extracelular, do tamponamento ou esgotando os estoques intracelulares), resulta em morte celular rápida; enquanto que o excesso de Ca^{2+} é extremamente tóxico, e a célula morre por sobrecarga de Ca^{2+} , representando o mecanismo geral mais provável de morte celular (RIZZUTO *et al.*, 2003). Altas concentrações de Ca^{2+} podem danificar a estrutura de ácidos nucleicos, de algumas proteínas ou de lipídeos (GRIJALBA *et al.*, 1999; VERCESI *et al.*, 1997), enquanto que níveis intermediários podem interferir no controle de quinases específicas e ativar proteases sensíveis a Ca^{2+} ou fosfatases, como a calcineurina, por exemplo, levando à morte celular (IWAI-KANAI & HASEGAWA, 2004; WANG *et al.*, 1999). O aumento de Ca^{2+} mitocondrial pode desencadear a inibição da fosforilação oxidativa, uma vez que o complexo Ca^{2+} -ADP formado compete com Mg -ADP na ligação ao sítio ativo da F_0F_1 -ATP sintase (VERCESI *et al.*, 1990). Desta forma, quando há aumento da concentração de Ca^{2+} mitocondrial e redução do nível de ATP, mecanismos de morte celular podem ser iniciados.

Alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial interna induzidas por Ca^{2+} podem ocorrer como consequência da ação de EROs geradas na mitocôndria (VERCESI *et al.*, 1993), pois estas organelas são organelas sensíveis à lesão por EROs geradas pela cadeia respiratória mitocondrial (KOWALTOWSKI *et al.*, 1999).

Muitos estudos associam a disfunção mitocondrial causada por EROs e por aumento de íons Ca^{2+} à morte celular tanto por necrose quanto por apoptose (ZECCHIN *et al.*, 2007; ZAMZAMI *et al.*, 1997).

1.3.4 O Processo Desencadeador de Morte Celular

Inúmeros sinais modulam a proliferação, sobrevivência e morte celular e a ação coordenada destes estímulos permite que a célula normal cresça e se divida até sua senescência (FOSTER, 2008; MESTER & REDEUILH, 2008). Entretanto, quando se trata de células tumorais, elas perdem a capacidade de regular esses sinais, resultando no descontrole da proliferação e na ausência de morte celular, contribuindo para o desenvolvimento de massas tumorais. Além de proliferarem continuamente, as células tumorais também apresentam uma característica conhecida como imortalidade replicativa, na qual a célula não é direcionada para o processo de senescência e posterior apoptose. No decorrer da vida de uma célula normal, os telômeros (sequências repetidas de DNA que formam as extremidades dos cromossomos) vão se encurtando e dirigindo a célula ao envelhecimento e morte celular programada. A telomerase, enzima que previne o encurtamento dos cromossomos, está presente em quantidades diferenciadas em células embrionárias e em células de câncer, pois além de prevenir o encurtamento dos cromossomos, retardando o envelhecimento celular, ela também ativa genes que permitem que as células dividam-se indefinidamente (HANAHAHAN e WEINBERG, 2011).

Normalmente, estímulos tóxicos ou deletérios à célula podem desencadear a morte celular por apoptose ou por necrose, que se diferenciam através da morfologia e vias bioquímicas celulares (FOSTER, 2008; KUWANA & NEWMAYER, 2003). A morte celular pode ser classificada de acordo com vários aspectos, tais como: aparência morfológica (que pode ser apoptótica, necrótica ou autofágica), critérios

enzimáticos (com e/ou sem envolvimento de nucleases ou de várias classes de proteases, tais como caspases, catepsinas, calpaínas e transglutaminases), aspectos funcionais (programada ou acidental, fisiológica ou patológica) ou características imunológicas (imunogênica ou não-imunogênica). Para que uma célula seja considerada morta um dos seguintes critérios morfológicos ou moleculares deve ser encontrado: perda da integridade de membrana plasmática, detectada pela incorporação de corantes vitais *in vitro*; quando a célula, incluindo seu núcleo, sofre completa fragmentação em corpos discretos, conhecidos como “corpos apoptóticos”; e/ou quando verifica-se *in vivo* o englobamento da célula morta ou fragmentos celulares por uma célula adjacente (KROEMER *et al.*, 2008).

A apoptose é coordenada por um conjunto de proteases cisteína/aspartato específicas conhecidas como caspases (ADAMS e CORY, 2007; STRASSER *et al.*, 2000; GREEN, 2000). Essas proteases são sintetizadas como zimogênios e, mediante estímulos apoptóticos, sofrem ativação proteolítica. Existem duas vias principais de regulação da apoptose: 1) Apoptose mediada por receptores de morte (TNF, TNFR1, TRAMP, TRAIL e Fas) presentes na membrana plasmática, denominada via extrínseca e 2) Apoptose mediada pela mitocôndria, denominada via intrínseca (ADAMS e CORY, 2007; HAIL *et al.*, 2006; WILLIS e ADAMS, 2005; HAJRA & LIU, 2004). Tanto a via extrínseca quanto a intrínseca possuem um grupo independente de caspases iniciadoras que convergem sinais para o mesmo grupo de caspases efetoras com a finalidade de executar eventos intracelulares que resultarão na morte celular programada (HAJRA & LIU, 2004; ZHANG *et al.*, 2004). Várias proteínas podem regular a ativação de caspases e grande parte dessas proteínas tem localização ou interação mitocondrial (RAVAGNAN *et al.*, 2002). O citocromo c, normalmente localizado no espaço intermembranas mitocondrial, pode ser liberado para o citosol, onde se liga a Apaf-1 (do inglês, *apoptosis activating factor 1*) e caspase 9, formando o apoptossomo, complexo de alto peso molecular responsável pela clivagem de várias pró-caspases (ADAMS e CORY, 2007; RAVAGNAN *et al.*, 2002; ZIMMERMANN *et al.*, 2001). As mitocôndrias também contém a proteína Smac/DIABLO, a qual inativa proteínas citosólicas responsáveis pela inibição de caspases. Também merece destaque, o AIF (do inglês, *apoptosis inducing factor*), uma proteína capaz de induzir condensação da cromatina nuclear de modo independente da ativação de caspases, e a endonuclease G, que promove

diretamente a fragmentação de DNA nuclear. Ambas estão, normalmente, localizadas no espaço intermembranas mitocondrial e migram para o citosol mediante estímulos pró-apoptóticos (RAVAGNAN *et al.*, 2002; VAN LOO *et al.*, 2001; LORENZO *et al.*, 1999).

A necrose, outra forma de morte celular, durante muito tempo foi descrita como um processo de morte acidental e descontrolado. Porém, diversos trabalhos têm evidenciado que a morte celular necrótica pode ser regulada por um conjunto de vias de transdução de sinais e mecanismos catabólicos. Domínios de receptores de morte (TNFR1, Fas/CD95 e TRAIL-R) e receptores Toll-like (TLR3 e TLR4) têm demonstrado que provocam necrose, particularmente na presença de inibidores de caspases (FESTJENS *et al.*, 2006). Alguns mediadores, organelas e processos celulares têm sido implicados na necrose, mas ainda não é claro como esses eventos interagem uns com os outros (KROEMER *et al.*, 2008). Entretanto, se sabe que esse fenômeno inclui alterações mitocondriais (desacoplamento, produção de EROs, estresse nitroxidativo por óxido nítrico ou compostos similares e permeabilização de membrana mitocondrial), alterações lisossomais (produção de EROs por reação de Fenton e permeabilização de membrana lisossomal), mudanças nucleares (hiperativação de PARP-1 e concomitante hidrólise de NAD⁺), degradação lipídica (ativação de fosfolipases, lipoxigenases e esfingomielinases), aumento na concentração de Ca²⁺ citosólico, o que resulta em sobrecarga mitocondrial e ativação de proteases como as catepsinas e/ou calpaínas. Apesar do conhecimento de todas essas alterações, a caracterização de uma morte celular por necrose é avaliada principalmente por permeabilização de membrana plasmática precoce e ausência de marcadores apoptóticos ou autofágicos (KROEMER *et al.*, 2008).

1.3.4.1 Transição de Permeabilidade Mitocondrial e Morte Celular

Há alguns anos, a mitocôndria era considerada uma organela cuja função se restringia à produção de energia através da fosforilação oxidativa. Mas, com o passar do tempo, ficou evidente que esta organela possui outra função: o controle

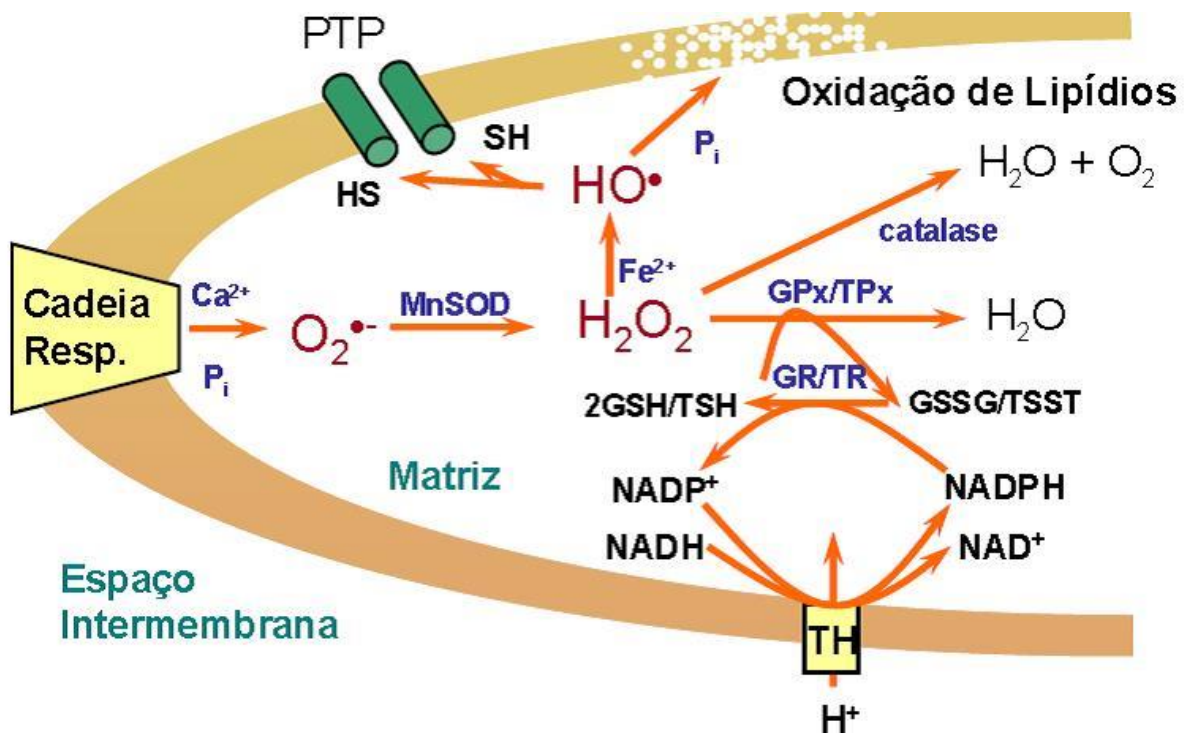
da morte celular (KROEMER *et al.*, 2007). A mitocôndria e a homeostase do cálcio regulam a geração de EROs mitocondrial, causando transição de permeabilidade da membrana mitocondrial (TPM) (MACIEL *et al.*, 2001; GRIJALBA *et al.*, 1999; CASTILHO *et al.*, 1995; KOWALTOWSKI *et al.*, 1995), um fenômeno caracterizado pela abertura de um poro proteico não específico, conhecido como poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM) (HUNTER, 1979), o qual desencadeia uma disfunção mitocondrial (KOWALTOWSKI *et al.*, 2001; KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999). Nesta condição, ocorre uma permeabilização gradativa da membrana mitocondrial interna a prótons, íons e pequenas proteínas (VERCESI, 1997). A permeabilização é dependente da presença de íons Ca^{2+} no espaço intramitocondrial, e é inibida por pequenas concentrações de ciclosporina A (CsA), um imunossupressor (BROEKEMEIER *et al.*, 1989; CROMPTON *et al.*, 1988) que inibe a abertura do PTPM devido à ligação da CsA à ciclofilina-D (CyD), que seriam necessárias para a abertura do poro. A estrutura básica do PTPM é sugerida contendo o canal ânion voltagem dependente (VDAC), o ANT e a CyD. A TPM é um mecanismo comum de disfunção da mitocôndria que ocorre na morte celular, e está relacionado à liberação de fatores pró-apoptóticos mitocondriais, devido ao inchamento da organela, com ruptura da membrana mitocondrial externa (GREEN & KROEMER, 2005).

A TPM induzida por íons Ca^{2+} pode ser estimulada por inúmeros compostos, tais como o fosfato inorgânico (P_i) (ROSSI & LEHNINGHER, 1964), oxidantes de nucleotídeos de piridina (VERCESI *et al.*, 1997; KOWALTOWSKI *et al.*, 1996a; KOWALTOWSKI *et al.*, 1996b), protonóforos (BERNARDI, 1992) e reagentes ditiólicos (BERNARDES *et al.*, 1994). Muitos destes compostos são capazes de aumentar o estresse oxidativo mitocondrial promovido pelo Ca^{2+} .

Os íons Ca^{2+} presentes dentro da mitocôndria ligam-se à cardiolipina da face interna da membrana mitocondrial interna, levando a uma modificação estrutural da cadeia respiratória, o que facilita a produção de radicais $\text{O}_2^{\bullet-}$, os quais são normalmente removidos pela MnSOD, promovendo a geração de radicais H_2O_2 (GRIJALBA *et al.*, 1999). O H_2O_2 é reduzido à água pelas enzimas glutathiona peroxidase (GP), tioredoxina peroxidase (TP) ou catalase (CAT). Glutathiona peroxidase reduzida (GSH) e Tioredoxina peroxidase reduzida (TSH) são

recuperados pelo sistema enzimático glutatona e tioredoxina redutases (GR e TR), que usam NADPH como doador de elétrons. NADH, que está presente em quantidades reguladas pela respiração, reduz então NADP⁺ usando a NAD(P) transidrogenase (TH). Quando a geração de O₂⁻ aumenta na presença de Ca²⁺ e P_i, e/ou os mecanismos de remoção de H₂O₂ estão inativados, H₂O₂ acumula-se e na presença de Fe²⁺ (reação de Fenton), gerando o radical OH[•] altamente reativo. OH[•] oxida tióis do complexo do PTPM, levando à formação e abertura do poro. Alternativamente, OH[•] pode promover permeabilização da membrana através da peroxidação lipídica, um processo fortemente estimulado por P_i. (KOWALTOWSKI *et al.*, 2001; VERCESI *et al.*, 1997; CASTILHO *et al.*, 1995) (Figura 9).

Figura 9: Modelo proposto para explicar a formação do poro de transição de permeabilidade induzido por Ca²⁺ e EROs na membrana mitocondrial interna. Fonte: KOWALTOWSKI *et al.*, 2001.



1.4 PLAQUETAS

As plaquetas são fragmentos citoplasmáticos anucleados presentes no sangue e produzidos a partir de megacariócitos na medula óssea (ITALIANO & HARTWIG, 2002; LEVIN, 2002). Do total das plaquetas presentes no organismo humano, cerca de 70% encontra-se no sangue periférico e o restante no baço, permanecendo na circulação durante uma média de dez dias, quando são retiradas pelas células reticuloendoteliais do baço e do fígado (SCHULZE & SHIVDASANI, 2005; ANDREWS & BERNDT, 2004; ITALIANO & HARTWIG, 2002). Apesar de apresentarem-se de forma simples ao microscópio óptico, as plaquetas possuem uma estrutura complexa (ANDREWS & BERNDT, 2004; HARTWIG, 2002), sendo dividida, internamente, em quatro zonas: zona externa ou periférica, zona sol-gel ou citosol, zona de organelas e sistema de membranas internas (LORENZI, 2006).

A zona periférica inclui as membranas externa e interna, que contém várias invaginações com um sistema de canais conectados à superfície, denominado sistema canalicular aberto (SCA). A membrana plaquetária possui antígenos, enzimas e várias glicoproteínas, que ficam permeadas entre os fosfolípidos de membrana, com a porção hidrofílica livre na zona periférica (Figura 10). Algumas glicoproteínas têm função específica de interação com determinados fatores de coagulação, como a GPIb que atua como receptor para a trombina e o fator de von Willebrand. As glicoproteínas IIb e IIIa formam um complexo (GPIIb-IIIa) extremamente abundante e que reconhecem o fibrinogênio, a fibronectina, a vitronectina e o fator de von Willebrand (FvW). Portanto, elas funcionam como alvos durante o processo de adesão, ou como receptores, desencadeando a ativação plaquetária (HEEMSKERK *et al.*, 2005; YIP *et al.*, 2005). As principais glicoproteínas de superfície plaquetária e seus ligantes específicos estão relacionados na Tabela 1. A camada dupla de fosfolípidos é importante para a coagulação, pois proporciona uma superfície onde alguns fatores serão ativados. Esses fosfolípidos servem também como substrato para produção de ácido araquidônico e consequentemente de tromboxano A₂ (TXA₂), potente agonista nos processos de agregação plaquetária e de vasoconstrição (FURIE & FLAUMENHAFT, 2001).

Figura 10: Modelo esquemático da anatomia da membrana plaquetária. ZP = zona periférica; CF = camada dupla de fosfolípídeos; P = proteína; GP = glicoproteínas; R = receptor; ENZ = enzima; SM = submembrana; MT = microtúbulos. Fonte: LORENZI, 2006.

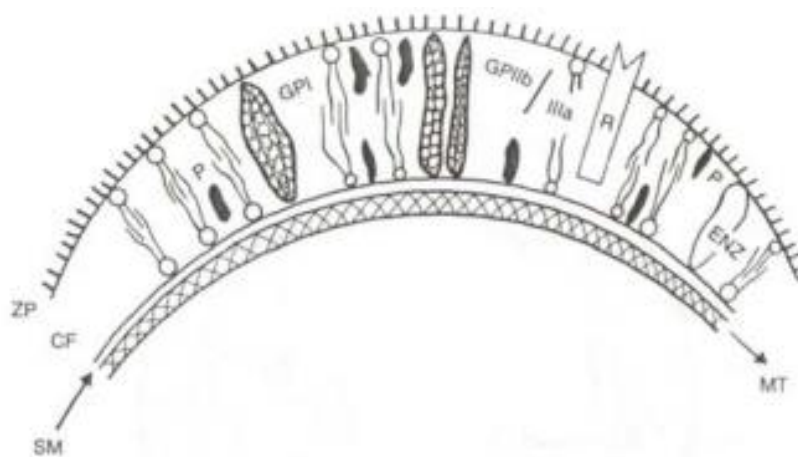


Tabela 1: Principais glicoproteínas plaquetárias de superfície e seus ligantes

Proteína de membrana	Receptor
GP1a-IIa	Colágeno
GP1b-IX-V	FvW, Trombina
GP1c-IIa	Fibronectina
GP1Ib-IIIa	Fibrinogênio, FvW, Fibronectina, Vitronectina
GP1V	Trombospondina, Colágeno
GPVI	Colágeno

A zona sol-gel está abaixo da zona periférica e é composta pelo *citoesqueleto*, que fornece a sustentação para a forma discoide ou elipsoide da plaqueta; e pelo *sistema contrátil*, o qual permite a mudança conformacional da plaqueta, com o prolongamento de pseudópodes, a contração interna e a liberação dos constituintes granulares. Os grânulos plaquetários apresentam entre 30% e 50% do conteúdo de proteína total da plaqueta (HARTWIG, 2002). Esta zona é formada por microtúbulos (tubulina) e microfilamentos (actina e miosina), os quais orientam a centralização dos

grânulos para a liberação do conteúdo através do sistema canalicular aberto na zona periférica (LORENZI, 2006).

A zona de organelas consiste basicamente de *grânulos alfa*, que contêm proteínas adesivas, FvW, trombospondina, fibronectina, vitronectina, fatores de crescimento derivado de plaquetas, fator IV plaquetário, fatores da coagulação e inibidor do ativador plasminogênio; *grânulos densos*, os quais possuem ATP, ADP, serotonina e cálcio; e *componentes celulares*, tais como lisossomos e mitocôndria, que além de conter ATP e ADP também participam dos processos metabólicos da plaqueta e armazenam enzimas e outras moléculas críticas para a função plaquetária (FLAUMENHAFT, 2003).

A última zona, conhecida como sistema de membranas internas inclui o *sistema tubular denso*, o qual concentra os íons cálcio, desencadeando a ativação de enzimas cálcio-dependentes e os eventos de contração após ativação plaquetária, além de estar envolvido na produção de síntese de prostaglandina e tromboxano (LORENZI, 2006; HARTWIG, 2002); e o *sistema canalicular aberto*, que é ligado intracelularmente ao sistema tubular denso, permitindo a troca de substâncias com o meio externo com a liberação de diversas moléculas após a ativação plaquetária (HARTWIG, 2002). Esta reação de secreção do conteúdo dos grânulos ocorre sem lise celular e com manutenção da integridade da membrana, apesar de haver mudanças nas suas características (FLAUMENHAFT, 2003).

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos biológicos, *in vitro*, de lectinas de *Cratylia mollis* em células de adenocarcinoma de próstata humano e em plaquetas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Escrever um artigo de revisão sobre os principais e mais recentes estudos de lectinas vegetais e animais associados ao diagnóstico ou uso terapêutico em células tumorais;
- Avaliar a viabilidade de células de adenocarcinoma de próstata humano (PC-3) através do ensaio utilizando MTT, após o tratamento *in vitro* com as lectinas Cramoll 1,4 e rCramoll;
- Investigar a morte de células tumorais PC-3 através do método de Annexina V-FITC / Iodeto de Propídio, após o tratamento *in vitro* com a Cramoll 1,4 e com a rCramoll;
- Analisar, *in vitro*, a liberação de Espécies Reativas de Oxigênio pelas células PC-3, após exposição às lectinas Cramoll 1,4 e rCramoll;
- Investigar, *in vitro*, a homeostase intracelular de cálcio após o tratamento das células PC-3 com as lectinas Cramoll 1,4 e rCramoll;
- Analisar os efeitos das lectinas Cramoll 1,4 ou rCramoll na função mitocondrial de células PC-3 através do monitoramento do potencial elétrico de membrana mitocondrial;

- Analisar o efeito de Cramoll 1,4 e de rCramoll sobre a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM);
- Avaliar a atividade das isolectinas Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 e Cramoll 4 nos processos de aglutinação de plaquetas lavadas obtidas de diferentes tipos sanguíneos, comparando com a atividade das lectinas WGA e ConA.

Referências Bibliográficas

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, J.M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, v. 26, n. 0, p. 1324-1337, 2007.
- ALBUQUERQUE, L. P. D. et al. Effect of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on survival and digestive enzymes of *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 75, n. 0, p. 158-166, 2012.
- AMANATULLAH, D. F. et al. Cell-cycle desregulation and the molecular mechanisms of prostate cancer. **Frontiers in Bioscience**, v. 5, p. 372-390, 2000.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 350, n. 1, p. 103-108, 1996.
- ANDRADE, C. A. S. et al. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, n. 2, p. 435-445, 2004.
- ANDREWS, R. K.; BERNDT, M. C. Platelet physiology and thrombosis. **Thrombosis Research**, v. 114, n. 5, p. 447-453, 2004.
- ARANDA-SOUZA, M.A. et al. A lectin from *Bothrops leucurus* snake venom raises cytosolic calcium levels and promotes B16-F10 melanoma necrotic cell death via mitochondrial permeability transition. **Toxicon**, v. 82, p. 97-103, 2014.
- ARAUJO, S.N.; MATRANGOLO, W.J.R.; MIRANDA, G.A.; NETTO, D.A.M.; DA SILVA, I.H.S. Análises das sementes de *Cratylia argentea*: cultura potencial para adubação verde e forragem/ Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 18 p. : il. -- (**Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo**, ISSN 1679-0154; 36), 2011.
- BANTEL, H. et al. Mistletoe Lectin Activates Caspase-8/FLICE Independently of Death Receptor Signaling and Enhances Anticancer Drug-induced Apoptosis. **Cancer Research**, v. 59, n. 9, p. 2083-2090, 1999.

- BECKER, J. W. et al. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. III. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 4, p. 1513-1524, 1975.
- BELTRÃO, E. C. et al. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 74, n. 3, p. 125-134, 1998.
- BERNARDES, C. F. et al. Ca^{2+} -dependent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1188, n. 1-2, p. 93-100, 1994.
- BERNARDI, P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 13, p. 8834-8839, May 5, 1992 1992.
- BERRIDGE, M. J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 1, n. 1, p. 11-21, 2000.
- BEUTH, J. et al. Importance of lectins for the prevention of bacterial infections and cancer metastases. **Glycoconjugate Journal**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 1995.
- BHOWAL, J.; GUHA, A. K.; CHATTERJEE, B. P. Purification and molecular characterization of a sialic acid specific lectin from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 12, p. 1973-1982, 2005.
- BIES, C.; LEHR, C.-M.; WOODLEY, J. F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 4, p. 425-435, 2004.
- BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochemical Journal**, v. 134, n. 3, p. 707-716, 1973.
- BROEKEMEIER, K. M.; DEMPSEY, M. E.; PFEIFFER, D. R. Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver

- mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 14, p. 7826-7830, 1989.
- BROOKS, S. A.; CARTER, T. M. N-acetylgalactosamine, N-acetylglucosamine and sialic acid expression in primary breast cancers. **Acta Histochemica**, v. 103, n. 1, p. 37-51, 2001.
- CALVETE, J. J. et al. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1430, n. 2, p. 367-375, 1999.
- CARLINI, C.R. GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides, **Toxicon**, v. 40, n. 11, p. 1515-1539, 2002.
- CARMELIET, E. Intracellular Ca^{2+} concentration and rate adaptation of the cardiac action potential. **Cell Calcium**, v. 35, n. 6, p. 557-573, 2004.
- CASTILHO, R. F. et al. Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, n. 3, p. 479-486, 1995.
- CHANDRA, N. R. et al. Structural similarity and functional diversity in proteins containing the legume lectin fold. **Protein Engineering**, v. 14, n. 11, p. 857-866, 2001.
- COELHO, L. C. B. B.; DA SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**, v. 11, n. 5, p. 295-300, 2000.
- COELHO, L. C. B. B.; et al. Protein Purification by Affinity Chromatography. In: Rizwan Ahmad. (Org.). **Protein Purification by Affinity Chromatography**, chapter 3; <http://www.intechopen.com/articles/show/title/protein-purification-by-affinity-chromatography..> 1ed. Rijeka, Croatia: INTECH Open Access Publisher, v. 1, p. 53-72, 2012.
- CORREIA, M. S.; COELHO, L. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* mart. (Camaratu Bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 55, n. 3, p. 261-273, 1995.

- CROMPTON, M.; ELLINGER, H.; COSTI, A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca^{2+} -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. **Biochemical Journal**, v. 255, n. 1, p. 357-360, 1988.
- DA SILVA, L. C. N. et al. *Cratylia mollis* Lectin: A Versatile Tool for Biomedical Studies. **Current Bioactive Compounds**, v. 10, n. 1, p. 44-54, 2014.
- DE LIMA, A. L. R. et al. Histochemical Evaluation of Human Prostatic Tissues with *Cratylia mollis* Seed Lectin. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 6, 2010.
- DE MELO, C. et al. Cramoll 1,4 lectin increases ROS production, calcium levels, and cytokine expression in treated spleen cells of rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 342, n. 1-2, p. 163-169, 2010a.
- DE MELO, C. M. L. et al. Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 11, p. 1631-1636, 2010b.
- DE MELO, C. M. L. et al. Mitogenic Response and Cytokine Production Induced by Cramoll 1,4 Lectin in Splenocytes of Inoculated Mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 73, n. 2, p. 112-121, 2011a.
- DE MELO, C. M. L. et al. Healing activity induced by Cramoll 1,4 lectin in healthy and immunocompromised mice. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 408, n. 1-2, p. 113-119, 2011b.
- DE MELO, C. M. L. et al. Potential effects of Cramoll 1,4 lectin on murine Schistosomiasis mansoni. **Acta Tropica**, v. 118, n. 2, p. 152-158, 2011c.
- DE OLIVEIRA, C. F. R. et al. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 498-504, 2011.
- DE SOUZA, G. A. et al. Amino acid sequence and tertiary structure of *Cratylia mollis* seed lectin. **Glycobiology**, v. 13, n. 12, p. 961-972, 2003.
- DEL SOL, F. G.; CAVADA, B. S.; CALVETE, J. J. Crystal structures of *Cratylia floribunda* seed lectin at acidic and basic pHs. Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer transition. **Journal of Structural Biology**, v. 158, n. 1, p. 1-9, 2007.

- DENMEADE, S. R.; ISAACS, J. T. A history of prostate cancer treatment. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 5, p. 389-396, 2002.
- DYPBUKT, J. M. et al. Different prooxidant levels stimulate growth, trigger apoptosis, or produce necrosis of insulin-secreting RINm5F cells. The role of intracellular polyamines. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 48, p. 30553-30560, 1994.
- EDELMAN, G. M. et al. The Covalent and Three-Dimensional Structure of Concanavalin A. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 69, n. 9, p. 2580-2584, 1972.
- ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 12, p. 462-467, 1997.
- FERNANDES, M. P. et al. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 42, n. 1, p. 69-78, 2010.
- FERNANDES, M. P. et al. The *Cratylia mollis* Seed Lectin Induces Membrane Permeability Transition in Isolated Rat Liver Mitochondria and a Cyclosporine A-Insensitive Permeability Transition in *Trypanosoma cruzi* Mitochondria. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 381-388, 2014.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.
- FESTJENS, N.; VANDEN BERGHE, T.; VANDENABEELE, P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1757, n. 9-10, p. 1371-1387, 2006.
- FLAUMENHAFT, R. Molecular basis of platelet granule secretion. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n.7, p. 1152-1560, 2003.
- FOSTER, I. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, v. 14, n. 2, p. 144-149, 2008.

- FU, L.-L. et al. Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 43, n. 10, p. 1442-1449, 2011.
- FURIE, B. C.; FLAUMENHAFT, R. A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granulate secretion, signaling and cell adhesion. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 86, n. 1, p. 214-221, 2001.
- GASTMAN, B. et al. A novel apoptotic pathway as defined by lectin cellular initiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, n. 1, p. 263-271, 2004.
- GEMEINER, P. et al. Lectinomics: II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 1-15, 2009.
- GIANSANTI, V.; TORRIGLIA, A.; SCOVASSI, A. I. Conversation between apoptosis and autophagy: "Is it your turn or mine?". **Apoptosis**, v. 16, n. 4, p. 321-333, 2011.
- GREEN, D. R. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. **Cell**, v. 102, n. 1, p. 1-4, 2000.
- GREEN, D. R.; KROEMER, G. Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 10, p. 2610-2617, 2005.
- GRIJALBA, M. T.; VERCESI, A. E.; SCHREIER, S. Ca²⁺-Induced Increased Lipid Packing and Domain Formation in Submitochondrial Particles. A Possible Early Step in the Mechanism of Ca²⁺-Stimulated Generation of Reactive Oxygen Species by the Respiratory Chain. **Biochemistry**, v. 38, n. 40, p. 13279-13287, 1999.
- GUNTER, K.; GUNTER, T. Transport of calcium by mitochondria. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 26, n. 5, p. 471-485, 1994.
- GUPTA, G.; SUROLIA, A.; SAMPATHKUMAR, S.-G. Lectin Microarrays for Glycomic Analysis. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 14, n. 4, p. 419-436, 2010.
- HAIL, N., JR. et al. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. **Apoptosis**, v. 11, n. 6, p. 889-904, 2006.

- HAJRA, K. M.; LIU, J. R. Apoptosome dysfunction in human cancer. **Apoptosis**, v. 9, n. 6, p. 691-704, 2004.
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, ROBERT A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- HARTLEY, M. R.; LORD, J. M. Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1701, n. 1-2, p. 1-14, 2004.
- HARTWIG, JH. Platelet structure. In: MICHELSON, A. D. **Platelets**. California: Academic Press, 2002.
- HEEMSKERK, J. W. et al. Platelet collagen receptors and coagulation. A characteristic platelet response as possible target for antithrombotic treatment. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 15, n. 3, p. 86-92, 2005.
- HILDER, V. A. et al. Expression of snowdrop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids. **Transgenic Research**, v. 4, n. 1, p. 18-25, 1995.
- HONG, M. et al. Sugar-lectin interactions investigated through affinity capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 752, n. 2, p. 207-216, 2001.
- HUNTER, D. R.; HAWORTH, R. A. The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria: I. The protective mechanisms. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 195, n. 2, p. 453-459, 1979.
- INADA, N. M. et al. Mitochondrial oxidative stress and permeability transition: Tumor cell death, immune response and dyslipidemias. In: (Ed.). **Free Radical Pathophysiology**: Transworld Research Network, v.1, 2008. p.207-222.
- INBAR, M.; SACHS, L. Interaction of the carbohydrate – binding protein Concanavalin A with normal and transformed cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 63, n. 4, p. 1418-1425, 1969.

- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA: 124 p. 2014.
- ITALIANO, J. E.; HARTWIG, J. H. Megakaryocyte development and platelet formation. In: MICHELSON, A. D. **Platelets**. California: Academic Press, 2002.
- IWAI-KANAI, E.; HASEGAWA, K. Intracellular signaling pathways for norepinephrine- and endothelin-1-mediated regulation of myocardial cell apoptosis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 259, n. 1-2, p. 163-168, 2004.
- KABIR, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. **Journal of Immunological Methods**, v. 212, n. 2, p. 193-211, 1998.
- KAIGHN, M. E. et al. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). **Investigative urology**, v. 17, n. 1, p. 16-23, 1979.
- KATOCH, B.; BEGUM, R. Biochemical basis of the high resistance to oxidative stress in *Dictyostelium discoideum*. **Journal of Biosciences**, v. 28, n. 5, p. 581-588, 2003.
- KAUR, M. et al. A tuber lectin from *Arisaema helleborifolium* Schott with anti-insect activity against melon fruit fly, *Bactrocera cucurbitae* (Coquillett) and anti-cancer effect on human cancer cell lines. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 445, n. 1, p. 156-165, 2006.
- KENNEDY, J. F. et al. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, n. 3, p. 219-230, 1995.
- KLINGENBERG, M. Uncoupling Proteins--How Do They Work and How Are They Regulated. **IUBMB Life**, v. 52, n. 3-5, p. 175-179, 2001.
- KLUG, W. S. et al. **Essentials of Genetics**. . 8. ed. Benjamin Cummings, 2012. 608 p.
- KONOZY, E. H. E. et al. Isolation, purification, and physicochemical characterization of a d-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 410, n. 2, p. 222-229, 2003.

- KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Ca^{2+} -induced mitochondrial membrane permeabilization: role of coenzyme Q redox state. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 269, n. 1, p. C141-C147, 1995.
- KOWALTOWSKI, A. J. et al. Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca^{2+} ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 6, p. 2929-2934, 1996a.
- KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of Ca^{2+} is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. **FEBS Letters**, v. 378, n. 2, p. 150-152, 1996b.
- KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 3-4, p. 463-471, 1999.
- KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Letters**, v. 495, n. 1-2, p. 12-15, 2001.
- KOWALTOWSKI, A. J. et al. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 4, p. 333-343, 2009.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 99-163, 2007.
- KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 1, p. 3-11, 2008.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins & Cotran / Patologia – Bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1504 p.
- KUWANA, T.; NEWMAYER, D. D. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 691-699, 2003

- LAUFER, M. et al. Complete androgen blockage for prostate cancer: what went wrong? **The Journal of Urology**, v. 164, n. 1, p. 3-9, 2000.
- LEHNINGER, A. L. **The mitochondrion: molecular basis of structure and function**. New York: W.A. Benjamin, 1964.
- LEI, H.-Y.; CHANG, C.-P. Induction of Autophagy by Concanavalin A and its Application in Anti-Tumor Therapy. **Autophagy**, v. 3, n. 4, p. 402-404, 2007.
- LEITE, H. P.; SARNI, R. S. Radicais livres, anti-oxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 18, n. 2, p. 87-94, 2003.
- LEVIN, J. The evolution of mammalian platelets. In: MICHELSON, A. D. **Platelets**. California: Academic Press, 2002.
- LI, C. Y. et al. Concanavalin A, from an old protein to novel candidate anti-neoplastic drug. **Current Molecular Pharmacology**, v. 3, n. 3, p. 123-8, 2010.
- LI, C.-Y. et al. Galanthus nivalis Agglutinin (GNA)-Related Lectins: Traditional Proteins, Burgeoning Drugs? **Current Chemical Biology**, v. 3, n. 3, p. 323-333, 2009.
- LIMA, V. L. M. et al. Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. **Carbohydrate Polymers**, v. 33, n. 1, p. 27-32, 1997.
- LIS, H.; SHARON, N. The Biochemistry of Plant Lectins (Phytohemagglutinins). **Annual Review of Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 541-574, 1973.
- LIU, B.; BIAN, H.-J.; BAO, J.-K. Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. **Cancer Letters**, v. 287, n. 1, p. 1-12, 2010.
- LIU, B. et al. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 482, n. 1-2, p. 1-6, 2009a.
- LIU, B. et al. Induction of apoptosis by *Polygonatum odoratum* lectin and its molecular mechanisms in murine fibrosarcoma L929 cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 8, p. 840-4, 2009b.

- LIU, S.-S. Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria. **Bioscience Reports**, v. 17, n. 3, p. 259-272, 1997.
- LORENZO, H. K. et al. Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. **Cell Death & Differentiation**, v. 6, n. 6, p. 516-524, 1999.
- LYU, S. Y. et al. Involvement of Caspase-3 in Apoptosis Induced by *Viscum album* var. *coloratum* Agglutinin in HL-60 Cells. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 65, n. 3, p. 534-541, 2001.
- MACIEL CARVALHO, E. et al. Detection of the first lectin with antimicrobial activity present in serum of the Amazonian fish tambaqui *Colossoma macropomum*. **Fisheries Science**, v. 78, n. 4, p. 879-887, 2012.
- MACIEL, E. N.; VERCESI, A. E.; CASTILHO, R. F. Oxidative stress in Ca^{2+} -induced membrane permeability transition in brain mitochondria. **Journal of Neurochemistry**, v. 79, n. 6, p. 1237-1245, 2001.
- MACIEL, E. V. M. et al. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals**, v. 32, n. 1, p. 57-60, 2004.
- MARÍN, J. et al. Mechanisms involved in the cellular calcium homeostasis in vascular smooth muscle: Calcium pumps. **Life Sciences**, v. 64, n. 5, p. 279-303, 1998.
- MESTER, J.; REDEUILH, G. Proliferation of breast cancer cells: regulation, mediators, targets for therapy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents**, v. 8, n. 8, p. 872-885, 2008.
- MITCHELL, P. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. **Nature**, v. 191, n. 4784, p. 144-148, 1961.
- MLADENOV, I. V. et al. Characterisation of 20-kDa lectin-spermagglutinin from *Arum maculatum* that prevents *Chlamydia pneumoniae* infection of L-929 fibroblast cells. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 249-254, 2002.
- MOREIRA, R. A. et al. Lectinas de Plantas. In: (Ed.). **Proceedings of the First Brazilian Congress on Proteins**. São Paulo: Editora da UNICAMP, 1991. p.71-96.

- MORENO, S. N. J.; DOCAMPO, R. Calcium regulation in protozoan parasites. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 359-364, 2003.
- MORENO, S. N. J. et al. Cytosolic-free calcium elevation in *Trypanosoma cruzi* is required for cell invasion. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 4, p. 1535-1540, 1994.
- MOURE, A.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H. Extraction and functionality of membrane-concentrated protein from defatted *Rosa rubiginosa* seeds. **Food Chemistry**, v. 74, n. 3, p. 327-339, 2001.
- MURDOCK, L. L. et al. Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. **Phytochemistry**, v. 29, n. 1, p. 85-89, 1990.
- NAPOLEÃO, T. et al. Affinity Matrices of *Cratylia mollis* Seeds Lectins for Isolation of Glycoproteins from Complex Protein Mixtures. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 171, p. 744-755, 2013.
- NAPOLEÃO, T.H. et al. Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. **Parasitology Research**, v. 110, n. 2, p. 609-616, 2012.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- NICHOLLS, D. G.; FERGUSON, S. J. Proton current and respiratory control. In: (Ed.). **Bioenergetics**, 2002. p.69-75.
- NICOTERA, P.; BELLOMO, G.; ORRENIUS, S. Calcium-Mediated Mechanisms in Chemically Induced Cell Death. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 32, n. 1, p. 449-470, 1992.
- NICOTERA, P.; ORRENIUS, S. The role of calcium in apoptosis. **Cell Calcium**, v. 23, n. 2-3, p. 173-180, 1998.
- Ng, T.B. Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins, **Peptides**, v. 25, n.7, p. 1215-1222, 2004.

- NUNES, E. D. S. et al. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 159, n. 1, p. 57-63, 2011.
- OLIVEIRA, M. D. L. et al. Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 371-376, 2008.
- OLIVEIRA, P. S. S. D. et al. *Cratylia mollis* 1, 4 Lectin: A New Biotechnological Tool in IL-6, IL-17A, IL-22, and IL-23 Induction and Generation of Immunological Memory. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 6, 2013.
- OSHIKAWA, K. et al. Purification and characterization of a basic amino acid-specific peptidase from seeds of jack bean (*Canavalia ensiformis*). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 64, n. 10, p. 2186-2192, 2000.
- PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Purification and Partial Characterization of two lectins isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu Bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, p. 113-118, 1992.
- PAIVA, P. M. G. et al. Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 7, p. 982-989, 2011.
- PEEHL, D. M. Primary cell cultures as models of prostate cancer development. **Endocrine-Related Cancer**, v. 12, n. 1, p. 19-47, 2005.
- PEREIRA, D. S. T. et al. Topical Application Effect of the Isolectin Hydrogel (Cramoll 1,4) on Second-Degree Burns: Experimental Model. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 11, 2012.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, n. 2, p. 347-352, 1995a.
- PEUMANS, W.; VAN DAMME, E. M. The role of lectins in plant defence. **The Histochemical Journal**, v. 27, n. 4, p. 253-271, 1995b.
- PEUMANS, W. et al. Classification of Plant Lectins in Families Of Structurally and Evolutionary Related Proteins. In: WU, A. (Ed.). **The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates - 2**: Springer US, v.491, 2001. cap. 3, p.27-54. (Advances in Experimental Medicine and Biology).

- PODOLSKY, M. J. et al. Characterization of an equine mannose-binding lectin and its roles in disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 343, n. 3, p. 928-936, 2006.
- POPULATION REFERENCE BUREAU. World Population Highlights - Focus on non communicable diseases. 2012. Disponível em: < http://www.prb.org/pdf12/2012-population-data-sheet_eng.pdf >. Acesso em: 24 de novembro de 2014.
- PUTNEY, J.W. & BIRD, G.St.J. Calcium mobilization by inositol phosphates and other intracellular messengers. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 5, n. 6, p. 256-260.
- RAVAGNAN, L.; ROUMIER, T.; KROEMER, G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. **Journal of Cellular Physiology**, v. 192, n. 2, p. 131-137, 2002.
- REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, n. 1, p. 1-13, 2003.
- REEKE, G. N.; BECKER, J. M.; EDELMAN, G. M. The Covalent and Three-Dimensional Structure of Concanavalin A. **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, p. 1525-1547, 1975.
- RIZZUTO, R. et al. Calcium and apoptosis: facts and hypotheses. **Oncogene**, v. 22, n. 53, p. 8619-8627, 2003.
- ROSSI, C. S.; LEHNINGER, A. L. Stoichiometry of Respiratory Stimulation, Accumulation of Ca^{++} and Phosphate, and Oxidative Phosphorylation in Rat Liver Mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 239, n. 11, p. 3971-3980, 1964.
- SAMARTSEV, V. N.; MOKHOVA, E. N.; SKULACHEV, V. P. The pH-dependent reciprocal changes in contributions of ADP/ATP antiporter and aspartate/glutamate antiporter to the fatty acid-induced uncoupling. **FEBS Letters**, v. 412, n. 1, p. 179-182, 1997.
- SANTOS, A. C. O.; PEIXOTO, C. A.; COELHO, L. C. B. B. Ultrastructural analysis and immunocytochemical localization of isolectins in *Cratylia mollis* seeds. **Micron**, v. 35, n. 7, p. 613-618, 2004.

- SANTOS, A. F. S. et al. Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 4, p. 504-508, 2009.
- SANTOS, N. D. D. L. et al. Oviposition-Stimulant and Ovicidal Activities of *Moringa oleifera* Lectin on *Aedes aegypti*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e44840, 2012.
- SANZ-APARICIO, J. et al. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. **FEBS Letters**, v. 405, n. 1, p. 114-118, 1997.
- SATO, Y. et al. Purification and characterization of a novel lectin from a freshwater cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 125, n. 2, p. 169-177, 2000.
- SCHULZE, H.; SHIVDASANI, R. A. Mechanisms of thrombopoiesis. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 3, n. 8, p. 1717-1724, 2005.
- SHARON, N.; LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, v. 177, n. 4053, p. 949-59, 1972.
- SHARON, N.; LIS, H. A century of lectin research (1888–1988). **Trends in Biochemical Sciences**, v. 12, p. 488-491, 1987.
- SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins - a large family of homologous proteins. **The FASEB Journal**, v. 4, n. 14, p. 198-208, 1990.
- SHARON, N. A centenary of lectins: impact on immunology. In: (Ed.). **Cellular Basis of Immune Modulation**. London: Alan R. Liss, 1989. p.609-619.
- SHARON, N.; GOLDSTEIN, I. J. Lectins: More than insecticides. **Science**, v. 282, p. 1049, 1998.
- SHARON, N.; LIS, H. The Structural Basis for Carbohydrate Recognition By Lectins. In: WU, A. (Ed.). **The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates - 2**: Springer US, v.491, 2001. cap. 1, p.1-16. (Advances in Experimental Medicine and Biology).
- SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R-62R, 2004.

- SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 5, p. 2753-2764, 2007.
- SILVA, M. C. C. et al. Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1049-1059, 2012.
- SILVA, M. C. C. et al. Immobilized *Cratylia mollis* lectin: An affinity matrix to purify a soybean (*Glycine max*) seed protein with in vitro platelet antiaggregation and anticoagulant activities. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 74-80, 2011.
- SKULACHEV, V. P. Fatty acid circuit as a physiological mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation. **FEBS Letters**, v. 294, n. 3, p. 158-162, 1991.
- SOUZA, J. D. et al. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, n. 5, p. 696-702, 2011.
- SOUZA, S. R. et al. A novel model to characterize the electric double layer of lectins from *Cratylia mollis* (Camaratu bean) and *Canavalia ensiformis* adsorbed on metallic surface. **Carbohydrate Polymers**, v. 46, n. 2, p. 191-193, 2001.
- SOUZA, S. R. et al. Electrochemical potential of free and immobilized *Cratylia mollis* seed lectin. **Bioresource Technology**, v. 88, n. 3, p. 255-258, 2003.
- SPRONG, T. et al. Mannose-binding lectin is a critical factor in systemic complement activation during meningococcal septic shock. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 9, p. 1380-1386, 2009.
- SRINIVAS, V. R. et al. Legume lectin family, the 'natural mutants of the quaternary state', provide insights into the relationship between protein stability and oligomerization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1527, n. 3, p. 102-111, 2001.
- STRASSER, A.; O'CONNOR, L.; DIXIT, V. M. Apoptosis signaling. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 217-245, 2000.

- SUROLIA, A.; SHARON, N.; SCHWARZ, F. P. Thermodynamics of monosaccharide and disaccharide binding to *Erythrina corallodendron* lectin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 30, p. 17697-17703, 1996.
- TSIVILEVA, O. M.; NIKITINA, V. E.; LOSHCHININA, E. A. Isolation and characterization of *Lentinus edodes* (Berk.) singer extracellular lectins. **Biochemistry (Moscow)**, v. 73, n. 10, p. 1154-1161, 2008.
- VAN DAMME, E. J. M. et al. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 6, p. 575-692, 1998.
- VAN EIJSDEN, R. et al. Sugar-binding activity of pea (*Pisum sativum*) lectin is essential for heterologous infection of transgenic white clover hairy roots by *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae. **Plant Molecular Biology**, v. 29, n. 3, p. 431-439, 1995.
- VAN LOO, G. et al. Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase independent DNA degradation. **Cell Death & Differentiation**, v. 8, n. 12, p. 1136-1142, 2001.
- VAREJÃO, N. et al. Heterologous expression and purification of a biologically active legume lectin from *Cratylia mollis* seeds (CRAMOLL 1). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 9, p. 1917-1924, 2010.
- VEGA, N.; PÉREZ, G. Isolation and characterisation of a *Salvia bogotensis* seed lectin specific for the Tn antigen. **Phytochemistry**, v. 67, n. 4, p. 347-355, 2006.
- VERCESI, A. E. Mitocôndria ATP, calor e morte celular. **Ciência Hoje**, v. 34, p. 16-23, 2003.
- VERCESI, A. E. et al. Calcium inhibition of the ATP in equilibrium with [32P]Pi exchange and of net ATP synthesis catalyzed by bovine submitochondrial particles. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1020, n. 1, p. 101-106, 1990.
- VERCESI, A. E.; HOFFMANN, M. E. Generation of reactive oxygen metabolites and oxidative damage in mitochondria: the role of calcium. In: JONES, D. P. e LASH, L. H. (Ed.). **Methods in Toxicology "Mitochondrial Dysfunction"**. New York: Academic Press, v.2, 1993. cap. 21, p.256-265.

- VERCESI, A. E. et al. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. **Bioscience Reports**, v. 17, n. 1, p. 43-52, 1997.
- VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v. 36, n. 3, p. 131-149, 2003.
- VIJAYAN, M.; CHANDRA, N. Lectins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, n. 6, p. 707-714, 1999.
- WANG, H.-G. et al. Ca^{2+} -Induced Apoptosis Through Calcineurin Dephosphorylation of BAD. **Science**, v. 284, n. 5412, p. 339-343, 1999.
- WILLIS, S. N.; ADAMS, J. M. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 17, n. 6, p. 617-25, 2005.
- WHO. Cancer. 2013. Disponível em: <
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html> >. Acesso em:
 03 de outubro de 2013.
- YIP, J. et al. Primary platelet adhesion receptors. **IUBMB Life**, v. 57, n. 2, p. 103-108, 2005.
- ZAMZAMI, N. et al. Mitochondrial implication in accidental and programmed cell death: apoptosis and necrosis. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 29, n. 2, p. 185-193, 1997.
- ZECCHIN, K. et al. High Bcl-2/Bax ratio in Walker tumor cells protects mitochondria but does not prevent H_2O_2 -induced apoptosis via calcineurin pathways. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 39, n. 2, p. 186-194, 2007.
- ZHANG, S.; ONG, C.-N.; SHEN, H.-M. Involvement of proapoptotic Bcl-2 family members in parthenolide-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis. **Cancer Letters**, v. 211, n. 2, p. 175-188, 2004.
- ZIMMERMANN, K. C.; BONZON, C.; GREEN, D. R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 92, n. 1, p. 57-70, 2001.

Manuscritos

4. MANUSCRITOS

4.1 MANUSCRITO 1

Lectins, Specific carbohydrate binding proteins and their effects on killing tumor cells: a short review

Evellyne de Oliveira Figueirôa^a; Raiana Apolinário de Paula^a; Mary Ângela Aranda-Souza^a; Luís Cláudio Nascimento da Silva^a; Maria Tereza dos Santos Correia^a

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

* Corresponding author. Tel.: +55 81 21268540; fax: +55 81 21268576. E-mail address: mtscorreia@gmail.com (M.T.S. Correia)

ABSTRACT

Lectins are proteins of non-immune origin, found in animals, plants, fungi and bacteria with the ability to recognize specific carbohydrate structures. They play important roles in cell recognition, trigger mechanisms of death. They are very important in the study of pathological conditions such as cancer. This review aims to provide some basic fundamentals of the structure and function of carbohydrates, the altered glycosylation patterns in tumor cells, carbohydrate recognition processes and induction of cell death, via apoptosis, necrosis or autophagy. In conclusion, molecules that bind to carbohydrates, such as lectins, are great candidates for cancer therapeutics.

Keywords: Lectins, Tumor cells, Cell death, Apoptosis; Necrosis; Reactive oxygen species, Mitochondrial permeability transition

1. INTRODUCTION

Lectins are a group of non-immunological proteins that exhibit the property of binding to carbohydrates specifically and reversibly. These molecules are distributed in nature in various organisms such as animals, plants, bacteria and fungi.

Most lectins are present in plants, mainly in the seeds, but may also be purified from other parts such as leaves, bark and roots. They have specific functions for plant survival, but its importance stands out due to the activities and biological applications after purification. One of the activities studied in recent years is the ability to induce death of tumor cell, as these have an altered glycosylation pattern on its surface, expressing altered oligosaccharide chains in greater quantities, which can be detected by the lectin. Thus, lectins have been used as important tools in the study of areas of cell biology, immunology, biochemistry and genetics.

We carried out a literature review on the structure and function of carbohydrates, the history of lectins, the interaction between these two macromolecules, changes in glycosylation patterns of tumor cells and the main studies on the effect of lectins in the death of cells, allowing us to understand the mechanism of action of these substances.

2. STRUCTURE AND FUNCTION OF CARBOHYDRATES

Carbohydrates, also known as hydrates of carbon, are the most abundant biomolecules found in nature [1]. The term "carbohydrate", originated because the simple sugars had chemical formula containing carbon, hydrogen and oxygen atoms, $C_nH_{2n}O_n$, with $n \geq 3$; they are poly-hydroxyaldehydes or poly-hydroxyketones, or even substances which release these compounds by hydrolysis.

They have various characteristics, which provide a greater structural diversity. Among them are the number of sugar monomers capable of performing glycosidic bonds with other residues; the number of carbon atoms; types of anomeric linkage; and the presence or absence of branching [2]. A single sugar residue is capable of

producing many different molecules, making use of these linking and branching characteristics, especially [3,4]. However, the most interesting is that carbohydrates are not encoded by the genome. But, what explains the wide variety of biological information they carry is that the glycosyltransferases and glycosidases are encoded by the genetic code [3,5].

Carbohydrates are involved in photosynthesis, are the basis of the diet in most of the world and are the largest non-photosynthetic energy source. They act as structural components or as protection in vegetable or bacterial cell walls, in addition to acting as a lubricant in joints. The wide variety and complexity of carbohydrates present on the cell surface allows them to act as signaling molecules, recognition and adhesion [4,6]. They are involved in many biological processes, such as cell growth and differentiation, cell-cell recognition, contact inhibition, pathogen-host interaction, development of diseases, metastasis and immune response [3,6-10].

3. LECTINS

Lectins are proteins or glycoproteins of non-immune origin, which bind specifically and reversibly to carbohydrate [11-13].

The study with lectins began in the 19th century, with the discovery that some plants aqueous extracts showed some toxicity to animals and agglutinated erythrocytes. At the time, it was believed that this effect occurred due to contamination by bacterial toxins. This hypothesis was broken when, in 1884, Bruylants and Vennerman demonstrated that the toxicity of *Abrus precatorius* seed was due to a protein fraction which could be precipitated with ethanol from aqueous extract, called abrin [14]. In 1888, Hermann Stillmark, a doctoral student at the University of Dorpat, Estonia, found that *Ricinus communis* extracts possessed the property of agglutinate erythrocytes. It has been shown that the active principle responsible for this cell agglutination ability was a protein called ricin. The term agglutinin was then disseminated to describe molecules that had the capacity to agglutinate erythrocytes or other cells. This information was very attractive and in the last decade of the 1800s, Paul Ehrlich, who worked with the *Ricinus communis* and *Abrus precatorius* lectins, introduced these molecules in researches that led to the Basic Immunology.

[15,16]. Only in 1954, Boyd and Shapleigh introduced the term "lectin" to designate a group of proteins that had a common feature: selectivity in their interaction with carbohydrates [17,18].

From the 60's, two major findings of researchers Peter C. Nowell and Joseph C. Aub began modern research with lectins. Nowell, in 1960, established that *Phaseolus vulgaris* lectin, known as phytohemagglutinin (PHA), has the ability to stimulate lymphocytes to enter mitosis, and that *Canavalia ensiformis* seed lectin, known as concanavalin A, or simply ConA (the first plant lectin purified by Summer, in 1919) also has the same mitogenic activity, but unlike PHA, ConA activity could be inhibited by low concentrations of monosaccharides, such as mannose. Aub, in the years 1963 and 1965, established that the wheat germ agglutinin, called WGA, has the ability to bind, preferably tumor cells. These investigations led to the hypothesis that changes in cell surface sugars are associated with the development of cancer, suggesting that the high susceptibility to agglutination by lectins was a property shared by all tumor cells [7].

Currently, the definition of lectin most accepted was proposed in the mid 90's when Peumans & Van Damme conceptualized lectins as non-immune proteins, which have a non-catalytic site for specific and reversible recognition of mono or oligosaccharides without changing the covalent structure glycosidic linkages [11,19,20].

They have wide distribution in nature and can be found in microorganisms [21, 22], animals [23-28] and plants [29-34]. The plant kingdom is a great source for purification of these macromolecules.

They have different characteristics, such as amino acid sequence, requisition of metals, molecular weight and three-dimensional structure. They have specific sites of binding to carbohydrates; are therefore able to interact with molecules of biological fluids and cell surface receptors. Among the biological activities include identification of blood groups, characterization of micro-organisms, mitogenic stimulation of immune cells, agglutination of the tumor cells and the detection and/or isolation of carbohydrate in solution or in macromolecules or cell surfaces [35-41] (Table 1).

Lectins have large structural diversity and have at least one site for binding to carbohydrates, also called carbohydrate recognition domain. They bind, reversibly,

carbohydrate or glycoconjugate in solution or that are connected to the cell envelope [11,42-46]. Some proteins have a single carbohydrate recognition domain, which is not sufficient to confer to them a functional characteristic of lectins, such as hemagglutination; however, this does not exclude them from belonging to this group.

The selectivity of lectins occurs due to multiple additional binding domains. The areas that determine the specificity of the lectin are called primary sites. Multiple linkages are provided by binding subsites or multivalent subunit.

Some lectins have stronger interaction with oligosaccharides compared to monosaccharides, while other lectins interact exclusively with monosaccharides. Taking into consideration the properties of binding to carbohydrates, lectins can be classified as specific as they interact with one monosaccharide or non-specific when interacting with different mono or oligosaccharides.

Van Damme et al. [12] grouped the lectins according to binding specificity to carbohydrates, including: fucose, mannose, sialic acid, N-acetylglucosamine, N-acetylgalactosamine/galactose and complex glycans.

The specificity of a lectin and confirmation of the presence in the sample are made through inhibition assays of hemagglutination activity with different monosaccharides, oligosaccharides or glycoproteins [45].

The carbohydrate binding sites are present, usually, at the surface of the protein molecule and binding selectivity is obtained by means of hydrogen bonds, Van der Waals interactions and hydrophobic interactions [46,48].

In order to identify and group lectins, they are also classified according to the topology of the carbohydrate recognition domain. They are divided into two groups according to Elgavish & Shaanan. Group I consists of transport lectins, such as the periplasmic carrier protein. In these lectins, binding sites are more internal, surrounding the ligand. In Group II are present the best known lectins. In this group, the lectin binding sites are more external, accommodating a carbohydrate ligand in a molecular surface depression [46].

According to the molecular structure and the number of binding domains, they can be divided into four groups: merolectins, hololectins, chimerolectins and superlectins [12] (Fig. 1).

Merolectins are small proteins that have only one carbohydrate recognition domain and are unable to precipitate glycoconjugates or to agglutinate cells. Hololectins are protein molecules which have, at least, two identical or very similar domains that bind to similar or identical sugar structures. They are able to agglutinate cells and precipitate glycoconjugates. Most plant lectins belonging to this group. Chimerolectins have, at least, two domains with different activities. One is able to recognize carbohydrate and the other has a distinct function, such as enzymatic activity. The superlectins have two carbohydrate recognition domains, similar to hololectinas. However, they can recognize sugars with different structures [12].

4. LECTIN-CARBOHYDRATE INTERACTION AND CHANGES IN GLYCOSYLATION PATTERN ON TUMOR CELLS

Changes in oligosaccharide domains of cell surface glycoconjugates may occur during normal cell development, being related to important physiological functions [8]. Signals are recognized by molecules, such as lectins, which act in a manner similar to the ligand-receptor complex [6]. However, there are many research showing that the phenotype changes of cell surface carbohydrates during malignant transformation and metastasis, as well as the expression level of endogenous lectins that bind to carbohydrates on the cell membranes [10,68-71]. For example, human and experimental tumors have increased levels of N-linked β -1,6-GlcNAc oligosaccharides [8, 72, 73].

Normal cells have multiple levels of regulation, which allows them do not become malignant cells and, consequently, invade surrounding tissues. However, when occurs genetic alterations, these cells begin to express more intensely some growth factors, and not react to tumor suppressor genes. Genetic and phenotypic alterations allow malignant cells replicate quickly, and escape into the surrounding tissues, mainly by angiogenesis [74]. One of the most interesting phenotypic changes, refers to the pattern of glycosylation in the cell membranes, which is different when comparing normal cells and transformed cells [8,10,68,75,76]. Altered membrane carbohydrates, such as glycoproteins and glycolipids, are often observed in

malignant cells due to altered activities of glycosyltransferases or glycosidases [2,8,10,68,74-76].

5. LECTINS AND CELL DEATH

Interest in the study of lectins increased since 1960, after checking that the *Phaseolus vulgaris* agglutinin (PHA) stimulates lymphocytes, resulting in mitotic division, and that the *Triticum vulgaris* agglutinin (WGA), wheat germ, is able to bring together more intensely transformed cells than normal cells [77]. Lectins such as PHA-L, is mitogenic for non-tumor cell line of human colon CRL-1459, and is cytotoxic to human colon cancer cells, belonging to the cell line CCL-220 [2,7,8]. After the discovery Inbar and Sachs, 1969, showed that ConA also preferably agglutinated malignant cells is that the lectins have an impulse on their research and application [78].

Lectins were proposed as mediators in disease therapy from 1988 by Woodley and Naisbett [17]. More studies have been done to discover drug systems acting at specific sites, increasing the effectiveness of treatment and difficult exposure of healthy cells or tissues to the side effects of drugs [79]. Drugs that cross the gastrointestinal tract are susceptible to degradation or changes due to the acidic environment of the presence of digestive enzymes or enzymes of bacterial origin [79]. The production of specific target drugs requires the presence and three components: drug, target and carrier, which may have direct or reverse via. The specific target in cancer therapy is also beneficial due of their potential cytotoxicity and apoptosis-inducing [2,8,80].

The toxic effect of the lectins is linked to its ability to modulate the growth, differentiation, proliferation and death of cells. In malignant cells, biochemical effects are associated with inhibition of synthesis of DNA, RNA and proteins. The cytotoxic effect of several lectins results in cell death processes, apoptosis or autophagy and necrosis, which may or not participation of mitochondria. These processes always aiming to eliminate harmful cells and maintain body homeostasis.

Apoptosis or type I programmed cell death is a very complex process of cell death, but highly defined, coordinated by a group of caspases [81-83] that are synthesized

as zymogens, and by apoptotic stimuli, undergo proteolytic activation. It can be mediated by death receptors (TNF, TNFR1, TRAMP, TRAIL and Fas) on the plasma membrane which is known as the extrinsic pathway or can be mediated by mitochondria, which is called intrinsic pathway [84,85]. Both routes have a specific group of proteases signals that converge, resulting in intracellular events that lead to cell death [85,86]. Apoptotic cell has condensed chromatin, fragmentation of DNA, volume loss and increased granularity of the cell, maintaining the structure of the organelles, formation of folds in the plasma membrane and cellular fragmentation into apoptotic bodies. The loss of plasma membrane asymmetry allows the exposure of internalized molecules, but integrity is not lost [87,88].

Necrosis is a type of cell death in which exposure to a strong aggression leads to irreversible cell injury. For a long time it was described as a process of accidental death, but necrotic cell death may be regulated by a multiple signal transduction pathways and catabolic mechanisms. Death Receptor (TNFR1, Fas/CD95 and TRAIL-R) and Toll-like receptors (TLR3 and TLR4) may trigger necrosis, particularly if they are in the presence of caspase inhibitors [89]. It remains unclear how necrotic events interact with each other [90], however there is swelling or rupture of the cell, denaturing and coagulation of cytoplasmic proteins and degradation of cellular organelles, including mitochondrial alterations (uncoupling, production of species reactive oxygen species, oxidative stress and changes in mitochondrial membrane permeability), lysosomal changes (production of reactive oxygen species by Fenton reaction and permeability of lysosomal membrane) and nuclear changes (hyperactivation of PARP-1 and concomitant hydrolysis of NAD^+). There is an increase in the concentration of cytosolic Ca^{2+} that results in mitochondrial overload and activation of proteases such as cathepsins and/or calpains (Fig. 2). The disruption of the plasma membrane seen in necrotic cell allows the cell contents output to the environment and can cause direct tissue damage or induction of a local inflammatory reaction [90].

Mitochondria was considered for a long time as an organelle whose function was restricted to the production of energy through oxidative phosphorylation. But over time, it became evident that this organelle has another function: the control of cell death [91]. The mitochondria and calcium homeostasis regulating mitochondrial ROS generation, causing permeability transition of mitochondrial membrane (PTM) [92-

95], a phenomenon characterized by an opening a non-specific protein pore, known as the mitochondrial permeability transition pore (MPTP) [96], which triggers mitochondrial dysfunction [97,98].

In this condition, there is a permeabilization of the inner mitochondrial membrane, with release of protons, ions and small proteins [99]. The permeabilization is dependent on the presence of Ca^{2+} ions in intramitochondrial space. The basic structure of MPTP is suggested containing the voltage dependent anion channel (VDAC), the adenine nucleotide translocator (ANT) and the cyclophilin-D (CyD). The PTM is a common mechanism of mitochondrial dysfunction that occurs in cell death, and it is related to the release of mitochondrial pro-apoptotic factors, due to swelling of the organelle with rupture of the outer mitochondrial membrane [100].

The Ca^{2+} ions present within mitochondria bind to cardiolipin at the inner face of the inner mitochondrial membrane, leading to a structural alteration of the respiratory chain, which facilitates the production of superoxide radicals ($\text{O}_2^{\cdot-}$), which are normally removed by the manganese dependent superoxide dismutase (MnSOD), promoting generation of hydrogen peroxide (H_2O_2) [93]. When the generation of $\text{O}_2^{\cdot-}$ increases in the presence of Ca^{2+} and/or ROS removal mechanisms are inactivated, occurs the thiol oxidation in MPTP complex, leading to the formation and opening of the pore [97].

The cancer is closely associated with apoptosis. However, if the molecules or apoptotic pathways used for the suppression of tumorigenesis are identified, come a perspective for new therapeutic targets. Various molecular components present in the cell death processes can be modulated by plant lectins [101] ou animal lectins [126]. These lectins have the characteristic of binding to cell surface glycoconjugates, which can trigger the mechanisms necessary for apoptotic, necrotic or autophagic cell death. Among the families of known lectins, the Proteins with legume lectin domains, Proteins with hevein domains, Ricin-B family and GNA family have been studied in recent years because of their its connection to various diseases such as cancer. Some plant lectins are used to differentiate malignant and benign tumors and the glycosylation pattern may be associated with the metastasis mechanism [8].

6. LECTINS TOXICITY TO TUMOR CELLS

Concanavalin A (ConA), the plant lectin most studied, specific for mannose/glucose carbohydrates has apoptosis-inducing activity and can initiate apoptotic cell death mediated by mitochondria [102]. It exerts a potent anti-hepatoma effect it binds to the cell membrane glycoproteins, it is internalized and causes autophagic cell death due to accumulation in the mitochondria [103]. ConA was also able to cause the death of murine macrophage line PU5-1.8 by apoptosis, inducing DNA fragmentation, clustering into regions near mitochondria and release of cytochrome *c* into the cytosol [104]. ConA exerted antiproliferative effect and induced apoptosis in A375 melanoma cells and HepG2 cells causing collapse of the mitochondrial membrane potential, release of cytochrome *c* and caspase activation [102,105,106]. Other plant lectins, such as Cramoll, obtained from *Cratylia mollis* seeds, also have the ability to inhibit growth or cause death of tumor cells. Cramoll can strongly bind to transformed cells, such as cells originating from the breast, uterus and brain tissues [107]. It can also bind to prostate tissues, and is a strong candidate for immunohistochemical probes [108] and encapsulation in liposomes enhances its antitumour activity and decreased toxicity [109].

WGA, wheat germ lectin, is a chitin-binding lectin, that promotes apoptosis in Jurkat cells through a mitochondrial pathway with a loss of transmembrane potential, disruption of the inner mitochondria membrane, release of cytochrome *c* and caspase-9 activation after 30 min of cell interaction [110]. Due to their interaction with sialic acid residues, WGA is internalized and triggers apoptotic characteristics such as chromatin condensation and DNA fragmentation, as well as stimulates the production of proinflammatory cytokines [111].

Mistletoe lectins (*Viscum album* L. coloratum), known as VCA, classified as type II ribosome-inactivating proteins (RIPsII), has antiproliferative activity and induces apoptotic mechanisms in cancer cells [112]. It induced cell death by apoptosis through caspase-3 activation in human myelocytic leukemia cells (HL-60) [113]. VCA has also been used to investigate the activities death in melanoma cells B16BL6 line, demonstrating that there is a decrease of cell growth and dose-dependent induction of apoptosis and angiogenesis [114]. VCA also induced apoptosis in hepatocellular

carcinoma cells of human SK-Hep-1 strains and Hep3B through activation of Bax and Bcl-2 inhibition [115]. Mistletoe lectins can be classified into three types: ML-I, ML-II and ML-III. They have the A-chains that contains three individual domains conserved and B-chains containing two domains with similar configuration. The specificity of the B chains of carbohydrates is essential for cytotoxic activity exerted by A chains. ML-I (which has two subunits – B-chain binds to the cell membrane and internalize the A-chain, which is involved in the inhibition of protein synthesis), active caspase-8 and promotes apoptosis by cytochrome c release in leukemic T and B cells [116,117]. ML-I can trigger cell death by apoptosis through cooperation mechanism with the death receptors of the TNF-family for some types of cancer [117]. ML-II promotes death receptors-independent apoptosis of myeloleukemic U937 cells. Apoptosis occurs because there is an increased production of pro-oxidants, such as H₂O₂, with changes in mitochondrial membrane potencial, which mediates cytochrome c release, activation of caspase-9 and caspase 3-like protease, chromatin condensation, nuclear fragmentation, DNA release, externalization of membrane phosphatidylserine and PARP cleavage [117,118].

It was reported that the lectin purified from *Polygonatum cyrtonema* – PCL – is able to induce cell death by apoptosis in HeLa cells, in A375 cells, in MCF-7 cells and L929 cells, but show low toxicity to normal cells [119-122]. The lectin-induced apoptosis, regulated by pro-apoptotic protein – BAK –, and anti-apoptotic protein – Bcl-2 and Bcl-xL – and triggering depolarization of the mitochondrial membrane, release of cytochrome c and caspase activation. This exposition of cells to PCL impaired the glutathione antioxidant system, promoting increased production of ROS and its accumulation in A375 cells, activating important proteins such as p53 and p38 [120]. PCL, OJL and LNL obtained from *P. cyrtonema*, *Ophiopogon japonicus*, and *Liparis noversa*, respectively, can growth inhibit brain adenocarcinoma cell – MCF-7 –, through a caspase-dependent pathway. These lectins have a similar tertiary structure and mannose binding sites, which are related phylogenetically [121]. PCL and OJL were able to induce apoptosis in L929 cells, with activation of caspases -9, -8 and -3, suggesting that this is a caspase-dependent pathway [122]. POL lectin purified from *Polygonatum odoratum* also has specificity for mannose and induces caspase-dependent apoptosis in L929 cells. There was a collapse of the mitochondrial membrane potential, release of cytochrome c and activation of

caspase-3 and caspase-9 [123]. Fig. 3 and Fig. 4 are schematic models of signaling pathways and mechanisms for inducing cell death by apoptosis or necrosis triggered by lectins derived from plants.

The C-type lectins are originated from animals and bind carbohydrate in a manner dependent of calcium ions. C-type lectins can be purified from the venom of snakes and show activity inducing tumor cell death. BIL, a galactose-binding C-type lectin, was purified from the venom of *Bothrops leucurus* [124] and shows activities related to toxicity to K562 cells, NCI-292 cells and Hep-2 cells, probably due to externalization of phosphatidylserine and collapse of the mitochondrial membrane potential [125]. This same lectin, BIL, also caused the death of B16F10 cells by necrosis due to increased ROS and $[Ca^{2+}]_{cyt}$, with the involvement of mitochondria via, Ca^{2+} overload and MPT pore opening [126].

6. CONCLUSIONS

Due to the growing number of studies of the mechanisms of cell death caused by exposure to lectins, they have been identified as promising candidates for antitumor drugs being tested in preclinical and clinical studies [127]. Plant lectins from Ricin-B family and proteins with legume lectin domains are families with more published research on the induction of cell death mechanisms [102-107,109,113-118]. However, other families of lectins has recently been studied and shown to be also able to induce the death of tumor cells. Cell death by apoptosis, necrosis or autophagy may occur by various molecular mechanisms, including: inactivating ribosomes of tumor cells; endocytosis of lectin and location on some organelles, such as mitochondria; or binding to sugar-containing receptors on the membrane of tumor cells [127]. These mechanisms can stimulate reactions within the cells able to induce cell death processes and novel anticancer agents must have a high efficiency and a low toxicity for normal tissues.

REFERENCES

- [1] Berg, J.; Tymoczko, J.; Stryer, L. *Biochemistry*. 7th ed; WH Freeman: New York, 2011.
- [2] Gorelik, E.; Galili, U.; Raz, A. On the Role of Cell Surface Carbohydrates and their Binding Proteins (lectins) in Tumor Metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, **2001**, 20 (3-4), 245-277.
- [3] Sharon, N. Carbohydrates. *Scientific American*, **1980**, 243 (5), 90-116.
- [4] Sharon, N.; Lis, H. Carbohydrates in cell recognition. *Scientific American*, **1993**, 268, 82-89.
- [5] Feizi, T.; Mulloy, B. Carbohydrates and glycoconjugates: Glycomics: the new era of carbohydrate biology. *Current Opinion in Structural Biology*, **2003**, 13 (5), 602-604.
- [6] Sharon, N.; Lis, H. Lectins as cell recognition molecules. *Science*, **1989**, 246 (4927), 227-234.
- [7] Sharon, N.; Lis, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*, **2004**, 14 (11), 53-62.
- [8] Mody, R.; Joshi, S. H. A.; Chaney, W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **1995**, 33 (1), 1-10.
- [9] Opdenakker, G.; Rudd, P. M.; Ponting, C. P.; Dwek, R. A. Concepts and principles of glycobiology. *The FASEB Journal*, **1993**, 7 (14), 1330-1337.
- [10] Blomme, B.; Van Steenkiste, C.; Callewaert, N.; Van Vlierberghe, H. Alteration of protein glycosylation in liver diseases. *Journal of Hepatology*, **2009**, 50 (3), 592-603.
- [11] Peumans, W.; van Damme, J. M.; Barre, A.; Rougé, P., Classification of Plant Lectins in Families Of Structurally and Evolutionary Related Proteins. In *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates* —2, Wu, A., Ed. Springer US: 2001; Vol. 491, pp 27-54.
- [12] Van Damme, E. J. M.; Peumans, W. J.; Barre, A.; Rougé, P., Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. *Critical Reviews in Plant Sciences* **1998**, 17 (6), 575-692.
- [13] Sharon, N.; Lis, H., Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science* **1972**, 177 (4053), 949-959.

- [14] Moreira, R. A.; Cavada, B. S.; De Oliveira, J. T. A.; Ainouz, I. L., Lectinas de Plantas. In *Proceedings of the First Brazilian Congress on Proteins*, Editora da UNICAMP: São Paulo, 1991.
- [15] Kennedy, J. F.; Palva, P. M. G.; Corella, M. T. S.; Cavalcanti, M. S. M.; Coelho, L. C. B. B., Lectins, versatile proteins of recognition: a review. *Carbohydrate Polymers* **1995**, 26 (3), 219-230.
- [16] Sharon, N.; Lis, H., *Lectins*. Chapman and Hall: London, 1989.
- [17] Bies, C.; Lehr, C.-M.; Woodley, J. F., Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2004**, 56 (4), 425-435.
- [18] Hartley, M. R.; Lord, J. M., Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2004**, 1701 (1-2), 1-14.
- [19] Peumans, W. J.; Van Damme, E. J., Plant lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **1998**, 33 (3), 209-258.
- [20] Peumans, W. J.; Van Damme, E. J., Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology* **1995a**, 109 (2), 347-352.
- [21] Tsvileva, O. M.; Nikitina, V. E.; Loshchinina, E. A., Isolation and characterization of *Lentinus edodes* (Berk.) singer extracellular lectins. *Biochemistry* **2008**, 73 (10), 1154-1161.
- [22] Bhowal, J.; Guha, A. K.; Chatterjee, B. P., Purification and molecular characterization of a sialic acid specific lectin from the phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina*. *Carbohydrate Research* **2005**, 340 (12), 1973-1982.
- [23] Maciel Carvalho, E.; Bezerra, R.; de Souza Bezerra, R.; de Araújo, J.; Guerra Santos, A.; dos Santos Correia, M.; Breitenbach Barroso Coelho, L., Detection of the first lectin with antimicrobial activity present in serum of the Amazonian fish tambaqui *Colossoma macropomum*. *Fish Sci* **2012**, 78 (4), 879-887.
- [24] Nunes, E. d. S.; de Souza, M. A. A.; Vaz, A. F. d. M.; Santana, G. M. d. S.; Gomes, F. S.; Coelho, L. C. B. B.; Paiva, P. M. G.; da Silva, R. M. L.; Silva-Lucca, R. A.; Oliva, M. L. V.; Guarnieri, M. C.; Correia, M. T. d. S., Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **2011**, 159 (1), 57-63.
- [25] Sprong, T.; Mollnes, T. E.; Neeleman, C.; Swinkels, D.; Netea, M. G.; van der Meer, J. W. M.; van Deuren, M., Mannose-Binding Lectin Is a Critical Factor in Systemic Complement Activation during Meningococcal Septic Shock. *Clinical Infectious Diseases* **2009**, 49 (9), 1380-1386.

- [26] Podolsky, M. J.; Lasker, A.; Flaminio, M. J. B. F.; Gowda, L. D.; Ezekowitz, R. A. B.; Takahashi, K., Characterization of an equine mannose-binding lectin and its roles in disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2006**, 343 (3), 928-936.
- [27] Mukherjee, S.; Zheng, H.; Derebe, M. G.; Callenberg, K. M.; Partch, C. L.; Rollins, D.; Propheter, D. C.; Rizo, J.; Grabe, M.; Jiang, Q.-X.; Hooper, L. V., Antibacterial membrane attack by a pore-forming intestinal C-type lectin. *Nature* **2014**, 505 (7481), 103-107.
- [28] Chikalovets, I. V.; Chernikov, O. V.; Pivkin, M. V.; Molchanova, V. I.; Litovchenko, A. P.; Li, W.; Lukyanov, P. A., A lectin with antifungal activity from the mussel *Crenomytilus grayanus*. *Fish & Shellfish Immunology* **2015**, 42 (2), 503-507.
- [29] Silva, M. C. C.; Santana, L. A.; Mentele, R.; Ferreira, R. S.; de Miranda, A.; Silva-Lucca, R. A.; Sampaio, M. U.; Correia, M. T. S.; Oliva, M. L. V., Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds. *Process Biochemistry* **2012**, 47 (7), 1049-1059.
- [30] Souza, J. D.; Silva, M. B. R.; Argolo, A. C. C.; Napoleão, T. H.; Sá, R. A.; Correia, M. T. S.; Paiva, P. M. G.; Silva, M. D. C.; Coelho, L. C. B. B., A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. *International Biodeterioration & Biodegradation* **2011**, 65 (5), 696-702.
- [31] Santos, A. F. S.; Luz, L. A.; Argolo, A. C. C.; Teixeira, J. A.; Paiva, P. M. G.; Coelho, L. C. B. B., Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. *Process Biochemistry* **2009**, 44 (4), 504-508.
- [32] Oliveira, M. D. L.; Andrade, C. A. S.; Santos-Magalhães, N. S.; Coelho, L. C. B. B.; Teixeira, J. A.; Carneiro-da-Cunha, M. G.; Correia, M. T. S., Purification of a lectin from *Eugenia uniflora* L. seeds and its potential antibacterial activity. *Letters in Applied Microbiology* **2008**, 46 (3), 371-376.
- [33] Vega, N.; Pérez, G., Isolation and characterisation of a *Salvia bogotensis* seed lectin specific for the Tn antigen. *Phytochemistry* **2006**, 67 (4), 347-355.
- [34] Correia, M. S.; Coelho, L. B. B., Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* mart. (Camaratu Bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology* **1995**, 55 (3), 261-273.
- [35] de Melo, C. M. L.; Melo, H.; Correia, M. T. S.; Coelho, L. C. B. B.; da Silva, M. B.; Pereira, V. R. A., Mitogenic Response and Cytokine Production Induced by Cramoll 1,4 Lectin in Splenocytes of Inoculated Mice. *Scandinavian Journal of Immunology* **2011a**, 73 (2), 112-121.
- [36] Maciel, E. V. M.; Araújo-Filho, V. S.; Nakazawa, M.; Gomes, Y. M.; Coelho, L. C. B. B.; Correia, M. T. S., Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals* **2004**, 32 (1), 57-60.

- [37] Sharon, N.; Lis, H., The Structural Basis for Carbohydrate Recognition By Lectins. In *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates* —2, Wu, A., Ed. Springer US: **2001**, 491 (1), 1-16.
- [38] Beltrão, E. I.; Correia, M. T.; Figueredo-Silva, J.; Coelho, L. C., Binding evaluation of Isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **1998**, 74 (3), 125-134.
- [39] Lima, V. L. M.; Correia, M. T. S.; Cechinel, Y. M. N.; Sampaio, C. A. M.; Owen, J. S.; Coelho, L. C. B. B., Immobilized *Cratylia mollis* lectin as a potential matrix to isolate plasma glycoproteins, including lecithin-cholesterol acyltransferase. *Carbohydrate Polymers* **1997**, 33 (1), 27-32.
- [40] Beuth, J.; Ko, H. L.; Pulverer, G.; Uhlenbruck, G.; Pichlmaier, H., Importance of lectins for the prevention of bacterial infections and cancer metastases. *Glycoconjugate J* **1995**, 12 (1), 1-6.
- [41] Lis, H.; Sharon, N., The Biochemistry of Plant Lectins (Phytohemagglutinins). *Annual Review of Biochemistry* **1973**, 42 (1), 541-574.
- [42] Hong, M.; Cassely, A.; Mechref, Y.; Novotny, M. V., Sugar-lectin interactions investigated through affinity capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **2001**, 752 (2), 207-216.
- [43] Souza, S. R.; Correia, M. T. S.; Pessoa, M. M. A.; Kennedy, J. F.; Lima-Filho, J. L.; Coelho, L. C. B. B., A novel model to characterize the electric double layer of lectins from *Cratylia mollis* (Camaratu bean) and *Canavalia ensiformis* adsorbed on metallic surface. *Carbohydrate Polymers* **2001**, 46 (2), 191-193.
- [44] Sato, Y.; Murakami, M.; Miyazawa, K.; Hori, K., Purification and characterization of a novel lectin from a freshwater cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology* **2000**, 125 (2), 169-177.
- [45] Vijayan, M.; Chandra, N., Lectins. *Current Opinion in Structural Biology* **1999**, 9 (6), 707-714.
- [46] Elgavish, S.; Shaanan, B., Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. *Trends in Biochemical Sciences* **1997**, 22 (12), 462-467.
- [47] Sharon, N.; Lis, H., Legume lectins--a large family of homologous proteins. *The FASEB Journal* **1990**, 4 (14), 3198-3208.
- [48] Surolia, A.; Sharon, N.; Schwarz, F. P., Thermodynamics of Monosaccharide and Disaccharide Binding to *Erythrina corallodendron* Lectin. *Journal of Biological Chemistry* **1996**, 271 (30), 17697-17703.
- [49] Santi-Gadelha, T.; de Almeida Gadelha, C. A.; Aragão, K. S.; de Oliveira, C. I. C.; Lima Mota, M. R.; Gomes, R. C.; de Freitas Pires, A.; Toyama, M. H.; de

- Oliveira Toyama, D.; de Alencar, N. M. N.; Criddle, D. N.; Assreuy, A. M. S.; Cavada, B. S., Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2006**, 350 (4), 1050-1055.
- [50] Yao, Q.; Wu, C.-f.; Luo, P.; Xiang, X.-c.; Liu, J.-j.; Mou, L.; Bao, J.-k., A new chitin-binding lectin from rhizome of *Setcreasea purpurea* with antifungal, antiviral and apoptosis-inducing activities. *Process Biochemistry* **2010**, 45 (9), 1477-1485.
- [51] de Melo, C. M. L.; de Castro, M. C. A. B.; de Oliveira, A. P.; Gomes, F. O. S.; Pereira, V. R. A.; Correia, M. T. S.; Coelho, L. C. B. B.; Paiva, P. M. G., Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. *Phytotherapy Research* **2010b**, 24 (11), 1631-1636.
- [52] Vanderlei, E. S. O.; Patoilo, K. K. N. R.; Lima, N. A.; Lima, A. P. S.; Rodrigues, J. A. G.; Silva, L. M. C. M.; Lima, M. E. P.; Lima, V.; Benevides, N. M. B., Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. *International Immunopharmacology* **2010**, 10 (9), 1113-1118.
- [53] Carrasco-Castilla, J.; Hernández-Álvarez, A. J.; Jiménez-Martínez, C.; Jacinto-Hernández, C.; Alaiz, M.; Girón-Calle, J.; Vioque, J.; Dávila-Ortiz, G., Antioxidant and metal chelating activities of *Phaseolus vulgaris* L. var. Jamapa protein isolates, phaseolin and lectin hydrolysates. *Food Chemistry* **2012**, 131 (4), 1157-1164.
- [54] de Melo, C. M. L.; de Lima, A. L. R.; Beltrão, E. I. C.; Cavalcanti, C. C. B.; de Melo-Júnior, M. R.; Montenegro, S. M. L.; Coelho, L. C. B. B.; Correia, M. T. d. S.; Carneiro-Leão, A. M. d. A., Potential effects of Cramoll 1,4 lectin on murine *Schistosomiasis mansoni*. *Acta Tropica* **2011c**, 118 (2), 152-158.
- [55] Fernandes, M. P.; Inada, N. M.; Chiaratti, M. R.; Araújo, F. F. B.; Meirelles, F. V.; Correia, M. T. S.; Coelho, L. C. B. B.; Alves, M. J. M.; Gadelha, F. R.; Vercesi, A. E., Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin. *J Bioenerg Biomembr* **2010**, 42 (1), 69-78.
- [56] Fernandes, M. P.; Leite, A. C. R.; Araújo, F. F. B.; Saad, S. T. O.; Baratti, M. O.; Correia, M. T. S.; Coelho, L. C. B. B.; Gadelha, F. R.; Vercesi, A. E., The *Cratylia mollis* Seed Lectin Induces Membrane Permeability Transition in Isolated Rat Liver Mitochondria and a Cyclosporine A-Insensitive Permeability Transition in *Trypanosoma cruzi* Mitochondria. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **2014**, 61 (4), 381-388.
- [57] Aranda-Souza, M. A.; Rossato, F. A.; Costa, R. A. P.; Figueira, T. R.; Castilho, R. F.; Guarniere, M. C.; Nunes, E. S.; Coelho, L. C. B. B.; Correia, M. T. S.; 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* **2014**, 82 (0), 97-103.

- [58] Silva, F. d. O.; Santos, P. d. N.; Figueirôa, E. d. O.; de Melo, C. M. L.; de Andrade Lemoine Neves, J. K.; Arruda, F. V. S.; Cajazeiras, J. B.; do Nascimento, K. S.; Teixeira, E. H.; Cavada, B. S.; Porto, A. L. F.; Pereira, V. R. A., Antiproliferative effect of *Canavalia brasiliensis* lectin on B16F10 cells. *Research in Veterinary Science* **2014**, 96 (2), 276-282.
- [59] Silva, L. C. N. d.; Alves, N. M. P.; Castro, M. C. A. B. d.; Pereira, V. R. A.; Paz, N. V. N. d.; Coelho, L. C. B. B.; Figueiredo, R. C. B. Q. d.; Correia, M. T. d. S., Immunomodulatory effects of pCramoll and rCramoll on peritoneal exudate cells (PECs) infected and non-infected with *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Biological Macromolecules* **2015**, 72 (0), 848-854.
- [60] de Melo, C.; Paim, B.; Zecchin, K.; Morari, J.; Chiaratti, M.; Correia, M.; Barroso Coelho, L.; Paiva, P., Cramoll 1,4 lectin increases ROS production, calcium levels, and cytokine expression in treated spleen cells of rats. *Mol Cell Biochem* **2010a**, 342 (1-2), 163-169.
- [61] Santos, N. D. d. L.; de Moura, K. S.; Napoleão, T. H.; Santos, G. K. N.; Coelho, L. C. B. B.; Navarro, D. M. d. A. F.; Paiva, P. M. G., Oviposition-Stimulant and Ovicidal Activities of *Moringa oleifera* Lectin on *Aedes aegypti*. *PLoS ONE* **2012**, 7 (9), e44840.
- [62] Napoleão, T.; Pontual, E.; de Albuquerque Lima, T.; de Lima Santos, N.; Sá, R.; Coelho, L.; do Amaral Ferraz Navarro, D.; Paiva, P., Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larvae. *Parasitol Res* **2012**, 110 (2), 609-616.
- [63] Vikram, D.; Kshitija, D.; Jatinder, S.; Kumar, S. A.; Kumar, A. S.; Singh, K. S., Purification and characterization of an Anti-proliferative and mitogenic plant lectin from tubers of *Arisaema speciosum*. *Pharmacognosy Journal* **2010**, 2 (9), 266-277.
- [64] Paiva, P. M. G.; Santana, G. M. S.; Souza, I. F. A. C.; Albuquerque, L. P.; Agra-Neto, A. C.; Albuquerque, A. C.; Luz, L. A.; Napoleão, T. H.; Coelho, L. C. B. B., Effect of lectins from *Opuntia ficus indica* cladodes and *Moringa oleifera* seeds on survival of *Nasutitermes corniger*. *International Biodeterioration & Biodegradation* **2011**, 65 (7), 982-989.
- [65] Albuquerque, L. P. d.; Maria de Sá Santana, G.; Pontual, E. V.; Napoleão, T. H.; Breitenbach Barroso Coelho, L. C.; Paiva, P. M. G., Effect of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on survival and digestive enzymes of *Nasutitermes corniger* (Isoptera, Termitidae). *International Biodeterioration & Biodegradation* **2012**, 75 (0), 158-166.
- [66] da Silva, L.C.N; Alves, N.M.O.; de Castro, M.C.A.B. et al. pCramoll and rCramoll as New Preventive Agents against the Oxidative Dysfunction Induced by Hydrogen Peroxide. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2015** Article ID 520872, in press.

- [67] da Silva, L.C.N.; Alves, N.M.O.; de Castro, M.C.A.B.; Pereira, V.R.A.; da Paz, N.V.N.; Coelho, L.C.B.B.; de Figueiredo, R.C.B.Q.; Correia, M.T.S. Immunomodulatory effects of pCramoll and rCramoll on peritoneal exudate cells (PECs) infected and non-infected with *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Biological Macromolecules* **2015**, 72 (0), 848-854.
- [68] Powlesland, A. S.; Hitchen, P. G.; Parry, S.; Graham, S. A.; Barrio, M. M.; Elola, M. T.; Mordoh, J.; Dell, A.; Drickamer, K.; Taylor, M. E., Targeted glycoproteomic identification of cancer cell glycosylation. *Glycobiology* **2009**, 19 (8), 899-909.
- [69] Shida, K.; Misonou, Y.; Korekane, H.; Seki, Y.; Noura, S.; Ohue, M.; Honke, K.; Miyamoto, Y., Unusual accumulation of sulfated glycosphingolipids in colon cancer cells. *Glycobiology* **2009**, 19 (9), 1018-1033.
- [70] Chandrasekaran, E. V.; Xue, J.; Neelamegham, S.; Matta, K. L., The pattern of glycosyl- and sulfotransferase activities in cancer cell lines: a predictor of individual cancer-associated distinct carbohydrate structures for the structural identification of signature glycans. *Carbohydrate Research* **2006**, 341 (8), 983-994.
- [71] Glavey, S. V.; Huynh, D.; Reagan, M. R.; Manier, S.; Moschetta, M.; Kawano, Y.; Roccaro, A. M.; Ghobrial, I. M.; Joshi, L.; O'Dwyer, M. E., The cancer glycome: Carbohydrates as mediators of metastasis. *Blood Reviews* **2015**.
- [72] Couldrey, C., E Green, J. Metastases: the glycan connection. *Breast Cancer Research* **2000**, 2 (0), 321-323.
- [73] Litynska, A.; Przybylo, M.; Pohech, E.; Hoja-Lukowicz, D.; Ciolczyk, D.; Laidler, P.; Gil, D. Comparison of the lectin-binding pattern in different human melanoma cell lines. *Melanoma Research* **2001**, 11 (3), 205-212.
- [74] Schwartz-Albiez, R.; Laban, S.; Eichmüller, S.; Kirschfink, M., Cytotoxic natural antibodies against human tumours: An option for anti-cancer immunotherapy? *Autoimmunity Reviews* **2008**, 7 (6), 491-495.
- [75] Oppenheimer, S. B.; Alvarez, M.; Nnoli, J., Carbohydrate-based experimental therapeutics for cancer, HIV/AIDS and other diseases. *Acta Histochemica* **2008**, 110 (1), 6-13.
- [76] Fukuda, M., Possible Roles of Tumor-associated Carbohydrate Antigens. *Cancer Research* **1996**, 56 (10), 2237-2244.
- [77] Sharon, N.; Lis, H. A century of lectin research (1888–1988). *Trends in Biochemical Sciences* **1987**, 12 (0), 488-491.
- [78] Inbar, M.; Sachs, L. Interaction of the carbohydrate – binding protein Concanavalin A with normal and transformed cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1969**, 63 (4), 1418-1425.

- [79] Rek, A., Krenn, E., Kungl, A.J. Therapeutically targeting protein–glycan interactions. *British Journal of Pharmacology* **2009**, 157 (0), 686-694.
- [80] Thies, A., Nugel, D., Pfüller, U., Moll, I., Schumacher, U. Influence of mistletoe lectins and cytokines induced by them on cell proliferation of human melanoma cells in vitro. *Toxicology* **2005**, 207 (0), 105-116.
- [81] Zimmermann, K.C., Bonzon, C., and Green, D.R. The machinery of programmed cell death. *Pharmacology & Therapeutics* **2001**, 92 (0), 57-70.
- [82] Strasser, A., O'Connor, L., and Dixit, V.M. Apoptosis Signaling. *Annual Review of Biochemistry* **2000**, 69 (0), 217-245.
- [83] Green, D.R. Apoptotic Pathways. *Cell* **2000**, 102 (1), 1-4.
- [84] Hail, N., Jr., Carter, B.Z., Konopleva, M., and Andreeff, M. Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed in different keys. *Apoptosis* **2006**, 11 (0), 889-904.
- [85] Hajra, K.M., and Liu, J.R. Apoptosome dysfunction in human cancer. *Apoptosis* **2004**, 9 (0), 691-704.
- [86] Zhang, S., Ong, C.-N., and Shen, H.-M. Involvement of proapoptotic Bcl-2 family members in parthenolide-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Cancer Letters* **2004**, 211 (0), 175-188.
- [87] Dini, L., Coppola, S., Ruzittu, M.T., Ghibelli, L. Multiple Pathways for Apoptotic Nuclear Fragmentation. *Experimental Cell Research* **1996**, 223 (0), 340-347.
- [88] Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., and Currie, A.R. Cell Death: The Significance of Apoptosis. *International Review of Cytology* **1980**, 68 (0), 251-306.
- [89] Festjens, N., Vanden Berghe, T., and Vandenabeele, P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2006**, 1757 (0), 1371-1387.
- [90] Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death & Differentiation* **2009**, 16 (0), 3-11.
- [91] Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Brenner, C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiological Reviews* **2007**, 87 (1), 99-163.
- [92] Maciel, E.N.; Vercesi, A.E.; Castilho, R.F. Oxidative stress in Ca²⁺-induced membrane permeability transition in brain mitochondria. *Journal of Neurochemistry* **2001**, 79 (6), 1237-1245.

- [93] Grijalba, M.T.; Vercesi, A.E.; Schreier, S. Ca^{2+} -Induced Increased Lipid Packing and Domain Formation in Submitochondrial Particles. A Possible Early Step in the Mechanism of Ca^{2+} -Stimulated Generation of Reactive Oxygen Species by the Respiratory Chain. *Biochemistry* **1999**, 38 (40), 13279-13287.
- [94] Castilho, R.F.; Kowaltowski, A.J.; Meinicke, A.R.; Bechara, E.J.; Vercesi, A.E. Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} ions is stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine* **1995**, 18 (3), 479-486.
- [95] Kowaltowski, A.J.; Castilho, R.F.; Vercesi, A.E. Ca^{2+} -induced mitochondrial membrane permeabilization: role of coenzyme Q redox state. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **1995**, 269 (1), 141-147.
- [96] Hunter, D.R.; Haworth, R.A. The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria: I. The protective mechanisms. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1979**, 195 (2), 453-459.
- [97] Kowaltowski, A.J.; Castilho, R.F.; Vercesi, A.E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Letters* **2001**, 495 (1-2), 12-15.
- [98] Kowaltowski, A.J.; Vercesi, A.E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* **1999**, 26 (3-4), 463-471.
- [99] Vercesi, A.E.; Kowaltowski, A.J.; Grijalba, M.T.; Meinicke, A.R.; Castilho, R.F. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Bioscience Reports* **1997**, 17 (1), 43-52.
- [100] Green, D. R.; Kroemer, G. Pharmacological manipulation of cell death: clinical applications in sight? *The Journal of Clinical Investigation* **2005**, 115 (10), 2610-2617.
- [101] Pusztai, A., Bardocz, S., and Ewen, S.W. Uses of plant lectins in bioscience and biomedicine. *Frontiers Bioscience* **2008**, 13 (0), 1130-1140.
- [102] Liu, B., Li, C.-y., Bian, H.-j., Min, M.-w., Chen, L.-f., and Bao, J.-k. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2009**, 482 (0), 1-6.
- [103] Chang, C.P., Yang, M.C., Liu, H.S., Lin, Y.S., and Lei, H.Y. Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model. *Hepatology* **2007**, 45 (0), 286-296.
- [104] Suen, Y.K., Fung, K.P., Choy, Y.M., Lee, C.Y., Chan, C.W., and Kong, S.K. Concanavalin A induced apoptosis in murine macrophage PU5-1.8 cells through clustering of mitochondria and release of cytochrome c. *Apoptosis* **2000**, 5 (0), 369-377.

- [105] Liu, B., Min, M.-W., and Bao, J.-K. Induction of apoptosis by Concanavalin A and its molecular mechanisms in cancer cells. *Autophagy* **2009**, 5 (0), 432-433.
- [106] Liu, Z., Li, X., Ding, X., and Yang, Y. In Silico and Experimental Studies of Concanavalin A: Insights into Its Antiproliferative Activity and Apoptotic Mechanism. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2010**, 162 (0), 134-145.
- [107] Beltrão, E.I.C., Correia, M.T.S., Figueredo-Silva, J., Coelho, L.C.B.B. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **1998**, 74 (0), 125-34.
- [108] De Lima, A.L.R., Cavalcanti, C.C.B., Silva, M.C.C., Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., Beltrão, E.I.C., and Correia, M.T.d.S. Histochemical Evaluation of Human Prostatic Tissues with *Cratylia mollis* Seed Lectin. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2010**, 2010 (0), 1-6.
- [109] Andrade, C.A.S., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Nascimento, S.C., Santos-Magalhães, N.S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* **2004**, 278 (0), 435-445.
- [110] Gastman, B., Wang, K., Han, J., Zhu, Z.-y., Huang, X., Wang, G.-Q., Rabinowich, H., and Gorelik, E. A novel apoptotic pathway as defined by lectin cellular initiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2004**, 316 (0), 263-271.
- [111] Pellegrina, C.D., Perbellini, O., Scupoli, M.T., Tomelleri, C., Zanetti, C., Zocatelli, G., Fusi, M., Peruffo, A., Rizzi, C., and Chignola, R. Effects of wheat germ agglutinin on human gastrointestinal epithelium: Insights from an experimental model of immune/epithelial cell interaction. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2009**, 237(0), 146-153.
- [112] Seifert, G., Jesse, P., Laengler, A., Reindl, T., Lüth, M., Lobitz, S., Henze, G., Prokop, A., and Lode, H.N. Molecular mechanisms of mistletoe plant extract-induced apoptosis in acute lymphoblastic leukemia in vivo and in vitro. *Cancer Letters* **2008**, 264 (0), 218-228.
- [113] Lyu, S.Y., Park, W.B., Choi, K.H., and Kim, W.H. Involvement of Caspase-3 in Apoptosis Induced by *Viscum album* var. *coloratum* Agglutinin in HL-60 Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2001**, 65 (0), 534-541.
- [114] Park, W.B., Lyu, S.Y., Kim, J.H., Choi, S.H., Chung, H.K., Ahn, S.H., Hong, S.Y., Yoon, T.J., and Choi, M.J. Inhibition of tumor growth and metastasis by Korean mistletoe lectin is associated with apoptosis and antiangiogenesis. *Cancer Biotherapy Radiopharmaceuticals* **2001**, 16 (0), 439-447.
- [115] Lyu, S.Y., Choi, S.H., and Park, W.B. Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in hepatocarcinoma cells is associated with inhibition of telomerase via mitochondrial controlled pathway independent of p53. *Archives of Pharmacal Research* **2002**, 25 (0), 93-101.

- [116] Bantel, H., Engels, I.H., Voelter, W., Schulze-Osthoff, K., and Wesselborg, S. Mistletoe Lectin Activates Caspase-8/FLICE Independently of Death Receptor Signaling and Enhances Anticancer Drug-induced Apoptosis. *Cancer Research* **1999**, 59 (0), 2083-2090.
- [117] Hoessli, D.C., and Ahmad, I. Mistletoe Lectins: Carbohydrate-Specific Apoptosis Inducers and Immunomodulators. *Current Organic Chemistry* **2008**, 12 (0), 918-925.
- [118] Kim, M.-S., Lee, J., Lee, K.-M., Yang, S.-H., Sujinna, C., Chung, S.-Y., Kim, T.-Y., Jeong, W.-H., and Park, R. Involvement of hydrogen peroxide in mistletoe lectin-II-induced apoptosis of myeloleukemic U937 cells. *Life Sciences* **2003**, 73 (0), 1231-1243.
- [119] Liu, B., Xu, X.C., Cheng, Y., Huang, J., Liu, Y.H., Liu, Z., Min, M.W., Bian, H.J., Chen, J., and Bao, J.K. Apoptosis-inducing effect and structural basis of *Polygonatum cyrtonema* lectin and chemical modification properties on its mannose-binding sites. *BMB Reports* **2008**, 41 (0), 369-375.
- [120] Liu, B., Cheng, Y., Zhang, B., Bian, H.-j., Bao, J.-k. *Polygonatum cyrtonema* lectin induces apoptosis and autophagy in human melanoma A375 cells through a mitochondria-mediated ROS–p38–p53 pathway. *Cancer Letters* **2009**, 275 (0), 54-60.
- [121] Liu, B., Peng, H., Yao, Q., Li, J., Van Damme, E., Balzarini, J., and Bao, J.-k. Bioinformatics analyses of the mannose-binding lectins from *Polygonatum cyrtonema*, *Ophiopogon japonicus* and *Liparis noversa* with antiproliferative and apoptosis-inducing activities. *Phytomedicine* **2009**, 16 (0), 601-608.
- [122] Zhang, Z.-t., Peng, H., Li, C.-y., Liu, J.-j., Zhou, T.-T., Yan, Y.-f., Li, Y., and Bao, J.-k. *Polygonatum cyrtonema* lectin induces murine fibrosarcoma L929 cell apoptosis via a caspase-dependent pathway as compared to *Ophiopogon japonicus* lectin. *Phytomedicine* **2010**, 18 (0), 25-31.
- [123] Liu, B., Zhang, B., Min, M.-w., Bian, H.-j., Chen, L.-f., Liu, Q., and Bao, J.-k. Induction of apoptosis by *Polygonatum odoratum* lectin and its molecular mechanisms in murine fibrosarcoma L929 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **2009**, 1790 (0), 840-844.
- [124] Nunes, E.d.S., de Souza, M.A.A., Vaz, A.F.d.M., Santana, G.M.d.S., Gomes, F.S., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G., da Silva, R.M.L., Silva-Lucca, R.A., Oliva, M.L.V., et al. Purification of a lectin with antibacterial activity from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **2011**, 159 (0), 57-63.
- [125] Nunes, E.S., Souza, M.A.A., Vaz, A.F.M., Silva, T.G., Aguiar, J.S., Batista, A.M., Guerra, M.M.P., Guarnieri, M.C., Coelho, L.C.B.B., and Correia, M.T.S. Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. *Toxicon* **2012**, 59 (0), 667-671.

- [126] Aranda-Souza, M.A., Rossato, F.A., Costa, R.A.P., Figueira, T.R., Castilho, R.F., Guarniere, M.C., Nunes, E.S., Coelho, L.C.B.B., Correia, M.T.S., and 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* **2014**, 82 (0), 97-103.
- [127] Fu, L.-l., Zhou, C.-c., Yao, S., Yu, J.-y., Liu, B., and Bao, J.-k. Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2011**, 43 (0), 1442-1449.

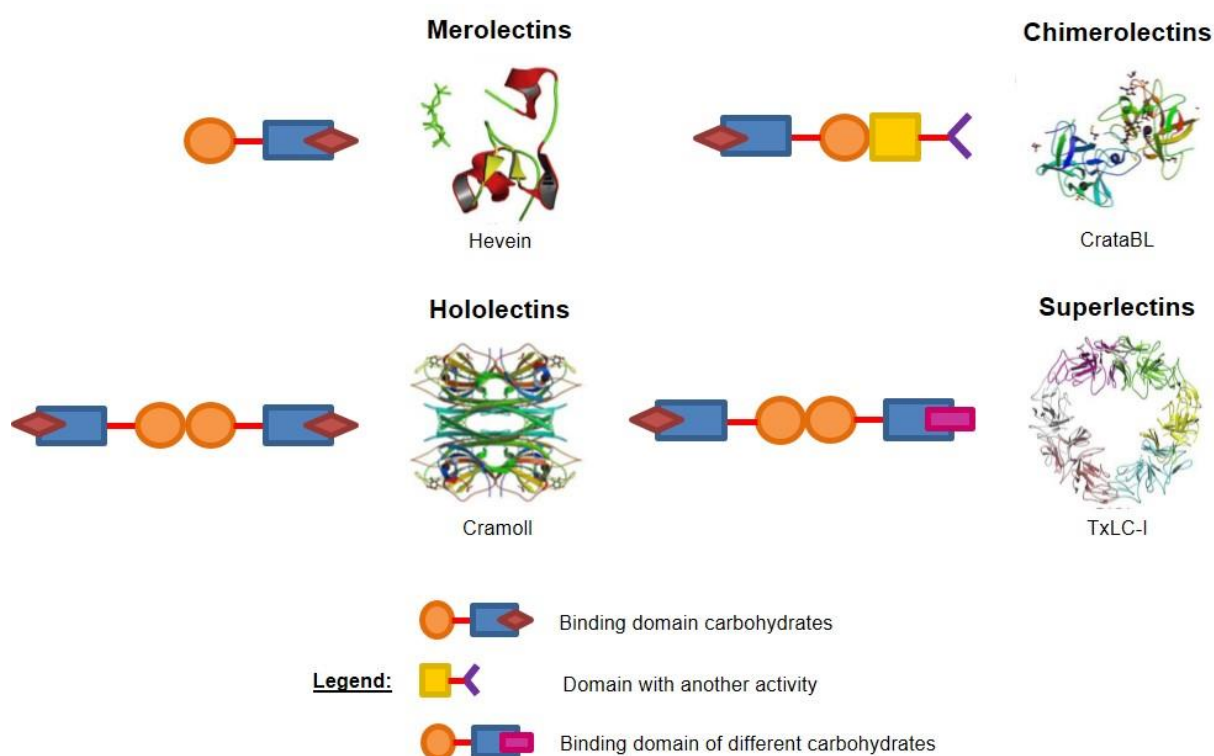


Fig. (1). Classification of lectins according to structural feature. Hevein from *Hevea brasiliensis*; CrataBL from *Crataeva tapia*, Cramoll from *Cratylia mollis* and TxLC-1 from *Tulipa gesneriana*. Adapted from Liu *et al.* (2010) and da Silva *et al.* (2014).

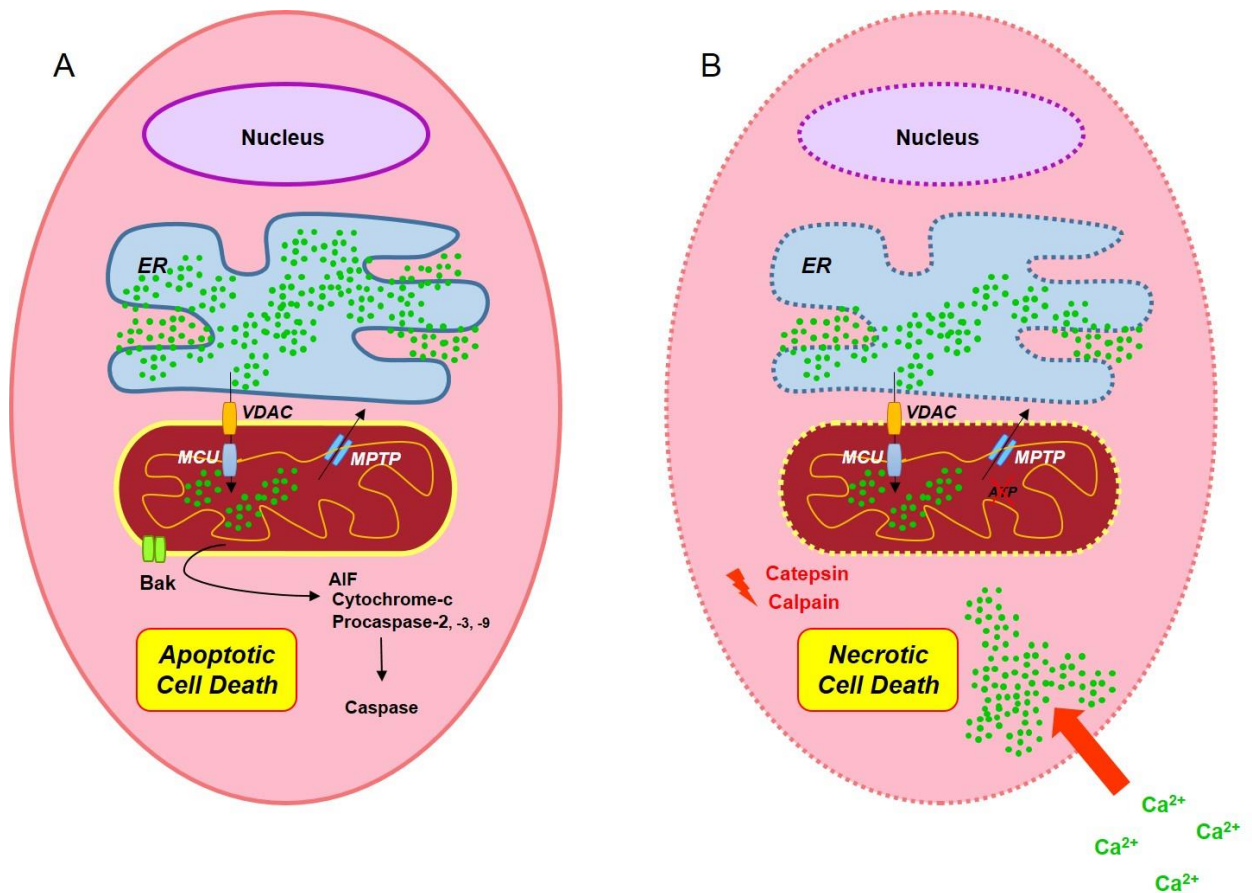


Fig. (2). Schematic representation of ionic changes and the concentration of cytosolic and mitochondrial calcium, activation of proteolytic enzymes, opening of the mitochondrial permeability transition pore, release apoptosis inducing factors and ATP depletion in accordance with the type of cell death, apoptosis (A) or necrosis (B).

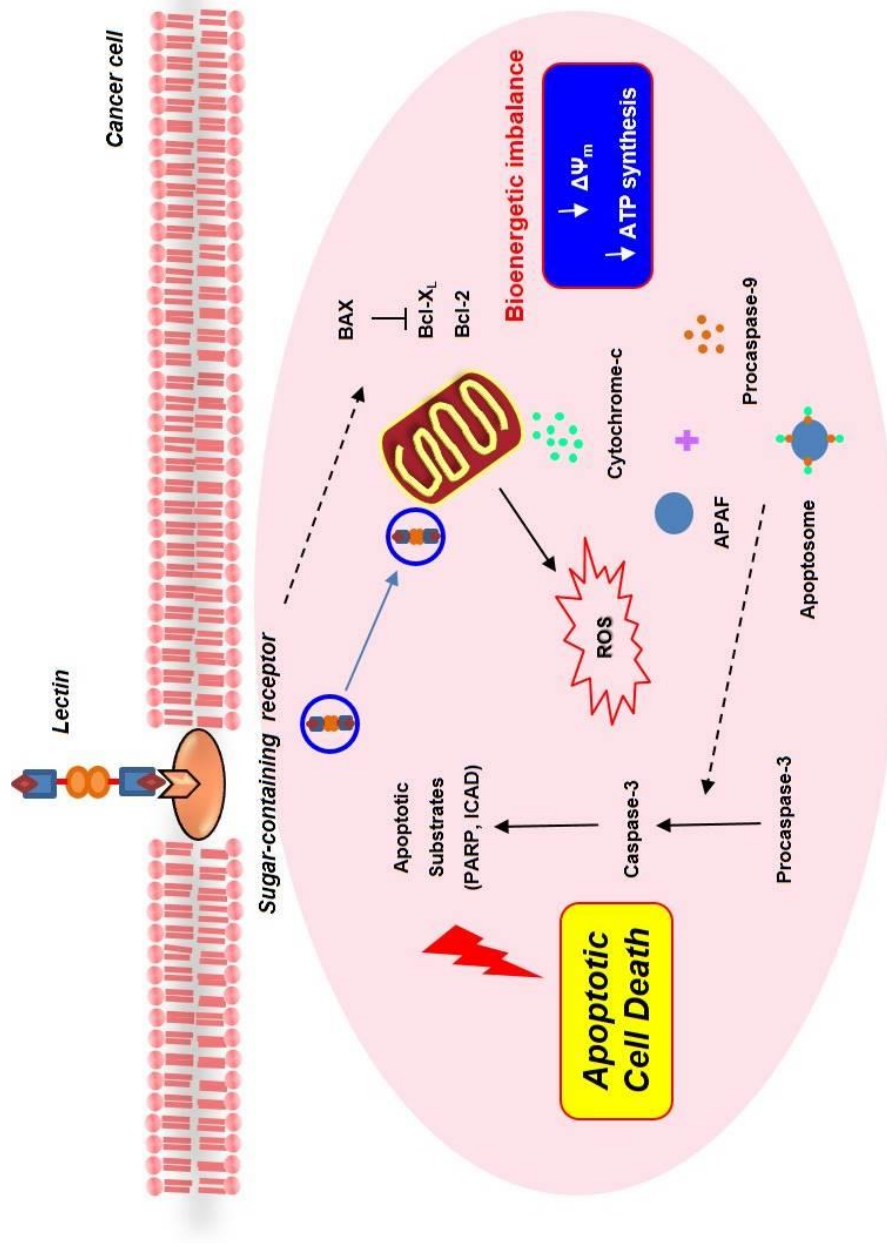


Fig. (3). Model of the molecular basis on lectin-induced apoptosis. Lectins induce apoptosis mainly mitochondrial pathways in tumor cells.

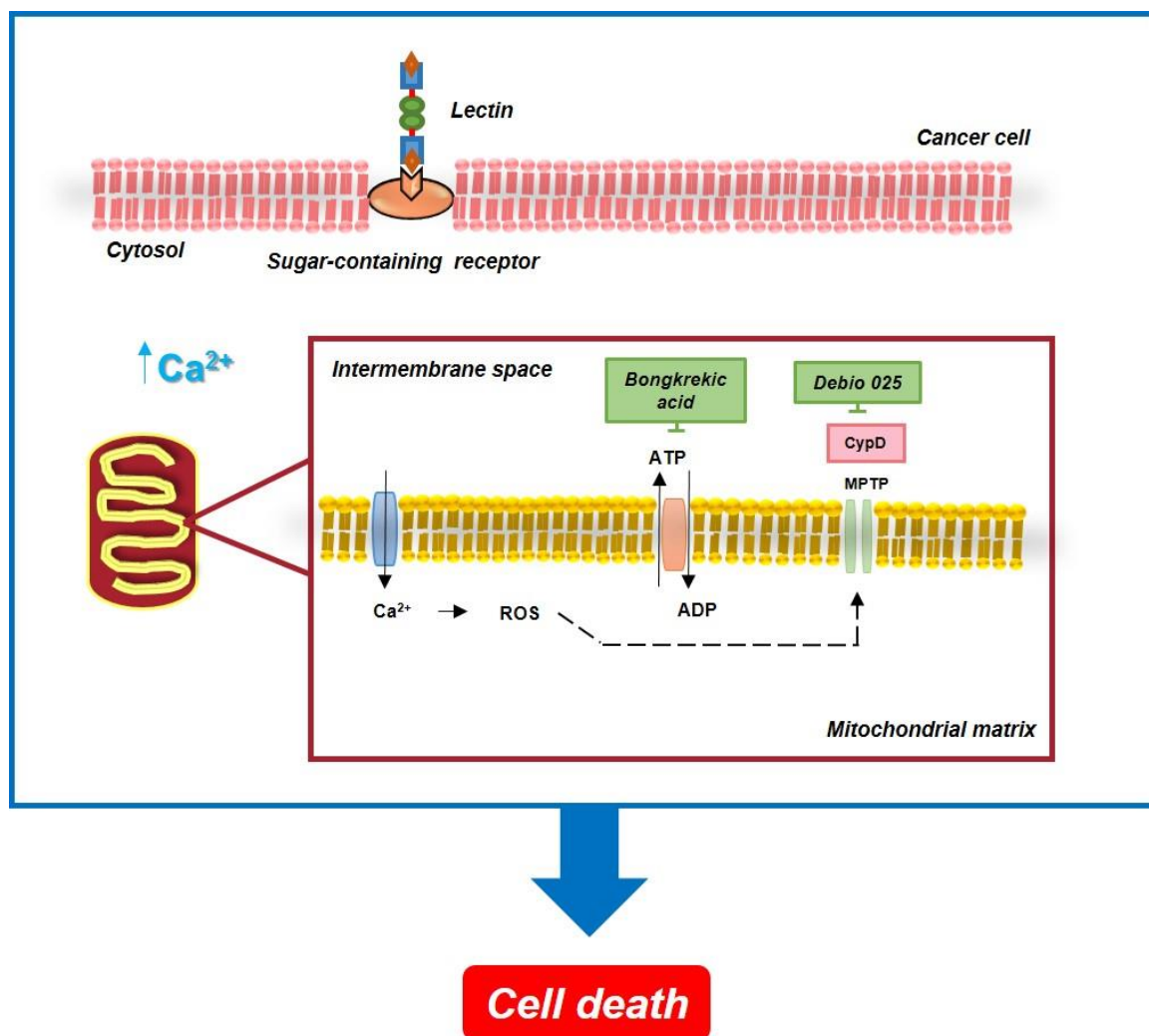


Fig. (4). Model of the molecular basis on lectin-induced necrosis. Lectins induce necrosis through mitochondrial pathways, increase cytosolic calcium and reactive oxygen species in tumor cells.

Table 1. Examples of the main biological activities of lectins.

Biological Activity	Species	Lectin	Reference
Antibacterial	<i>Araucaria angustifolia</i>	AaL	[49]
Anticoagulant	<i>Daboia ruselli ruselli</i>	RVsnaclec	[27]
Antifungal	<i>Crenomytilus grayanus</i> <i>Setcreasea purpurea</i>	CGL SPL	[28] [50]
Anti-inflammatory	<i>Araucaria angustifolia</i> <i>Cratylia mollis</i> <i>Caulerpa cupressoides</i>	AaL Cramoll 1,4 CcL	[49] [51] [52]
Antinociceptive	<i>Caulerpa cupressoides</i>	CcL	[52]
Antioxidant	<i>Phaseolus vulgaris</i> <i>Cratylia mollis</i>	PHA Cramoll 1,4/rCramoll	[53] [66]
Anti-parasite	<i>Cratylia mollis</i>	Cramoll 1,4	[54-56]
Antitumoral	<i>Bothrops leucurus</i>	BIL	[57]
Antiviral	<i>Setcreasea purpurea</i>	SPL	[50]
Immunomodulatory	<i>Canavalia brasiliensis</i> <i>Cratylia mollis</i>	ConBr Cramoll 1,4/rCramoll	[58] [35,59,60,67]
Larvicide	<i>Moringa oleifera</i> <i>Myracrodruon urundeuva</i>	WSMoL MuLL	[61] [62]
Mitogenic	<i>Arisaema speciosum</i>	ASL	[63]
Termiticide	<i>Opuntia ficus indica</i> <i>Microgramma vacciniifolia</i>	OfiL MvRL	[64] [65]

4.2 MANUSCRITO 2

Mechanism of human prostate adenocarcinoma cells (PC-3) death induced by Cramoll 1,4 and rCramoll lectins

Evellyne de Oliveira Figueirôa^a; Mary Ângela Aranda-Souza^a, Nathalia Varejão Nogueira da Paz^b; Franco Aparecido Rossato^c; Rute Alves Pereira Costa^c; Tiago Rezende Figueira^c; Roger Frigério Castilho^c; Aníbal Eugênio Vercesi^c; Maria Tereza dos Santos Correia^a

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

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

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

* Corresponding author. Tel.: +55 81 21268540; fax: +55 81 21268576. E-mail address: mtscorreia@gmail.com (M.T.S. Correia)

ABSTRACT

Lectins were purified from a plant native to Brazil, *Cratylia mollis*. Cramoll 1,4 is a lectin specific for mannose/glucose, with similarity to ConA. A recombinant form of Cramoll 1 (rCramoll) has been expressed and purified by introducing a bacterial expression vector containing a chemically synthesized DNA encoding amino acid sequence of Cramoll 1. This study evaluated molecular mechanisms by which Cramoll 1,4 and rCramoll induce death of human prostate adenocarcinoma cells (PC-3). For this, tests were performed to evaluate the viability and type of cell death by MTT assay and flow cytometry, respectively. Analysis using fluorescent probes MitoSox Red and Fura 2-AM measured the rate of mitochondrial superoxide generation and cytosolic free calcium concentration, respectively. Mitochondrial membrane potential was studied by safranin O fluorescence. Cramoll 1,4 and rCramoll were capable of killing PC-3 cells by necrosis. These lectins have a similar action mechanism, increasing by three-fold the generation of ROS as well as the concentration of cytosolic calcium. These changes lead to a decrease in oxidative phosphorylation, impairing the formation of ATP, leading to cell death, which cannot be protected using MPT inhibitors Debio 025 or bongkreikic acid. These data suggest that Cramoll 1,4 and rCramoll promote the PC-3 cell death by necrosis through calcium signaling with an increase in mitochondrial ROS.

Keywords: *Cratylia mollis*, Cell death, PC-3 cells, Reactive oxygen species, Cytosolic calcium, Mitochondrial permeability transition

1. INTRODUCTION

Lectins are known as a wide class of proteins that do not belong to the immune system, but are able of recognize specific sites and bind reversibly to carbohydrates, without changing the structure of their ligands. They are proteins which exhibit a wide variety of structure and size (Peumans et al., 2001; Peumans & Van Damme, 1998; Peumans & Van Damme, 1995). Lectins are found in several sources, but purification of these molecules occurs mainly from legume seeds, representing up to 10% of the total protein content (Sharon et al., 2004; Konozy et al., 2003). Plant lectins represent the largest group, but differ in structure, the specificity of carbohydrates and biological activities (Liu et al., 2010; Van Damme et al., 1998).

Cratylia mollis is a species native to semi-arid region of Brazil (Caatinga biome), it is popularly known as camaratu bean. Four lectin isoforms have been purified from seeds of *C. mollis*, named Cramoll -1, -2, -3, and -4, which have distinct specificity for carbohydrates (Correia & Coelho, 1995; Paiva & Coelho, 1992). It has also been reported the expression and purification of recombinant Cramoll 1 (rCramoll) in *Escherichia coli* by introduction of a chemically synthesized DNA encoding the lectin amino acid sequence within a bacterial vector expression (Varejão et al., 2010).

Biological activities of *C. mollis* lectins have been studied over the years. Cramoll 1,4 have immunomodulatory property due to its ability to induce mitogenic effect on T lymphocytes, as well as ConA (Maciel et al., 2004). The mitogenic activity was also demonstrated in splenic lymphocytes of Balb/c mice inoculated for two days with a single intraperitoneal dose at a concentration of 100 µg/ml Cramoll 1,4. This work showed that Cramoll 1,4 was able to stimulate significant amounts of cells in the S phase of the cell cycle and high levels of IL-2, IL-6 and IFN-γ as well as nitric oxide production (de Melo et al., 2011a). In a similar study, the BALB/c mice were inoculated with a single intraperitoneal dose at a concentration of 235 µg/ml Cramoll 1,4 and analysis of splenocytes after seven days showed an increased production of cytosolic and mitochondrial reactive oxygen species (ROS) as well as calcium increased levels (de Melo et al., 2010a). Cramoll 1,4 induces Th1 response by IFN-γ production and shows anti-inflammatory activity by nitric oxide in suppression of lymphocyte experimental (de Melo et al., 2010b). It is able to generate immunological

memory by IL-6, IL-17A, IL-22 and IL-23 induction by BALB/c mice lymphocytes or mononuclear cells from peripheral blood of humans (Oliveira et al., 2013).

Cramoll 1,4 caused the death of *Trypanosoma cruzi* by necrosis and this death is associated with mitochondrial membrane permeabilization by lectin, allowing the entry of Ca^{2+} and its accumulation in the mitochondria, increasing the levels of ROS (Fernandes et al., 2010). Another study compared treatment with Cramoll 1,4 in *T. cruzi* mitochondria and isolated rat liver mitochondria and revealed that the lectin is capable of causing increases in levels of ROS, characterizing an oxidative stress. This increase is directly related to opening of the permeability transition pore (PTP), and the mitochondrial permeability transition (MPT) can be inhibited by cyclosporin A (CsA) only in rat liver mitochondria (Fernandes et al., 2014).

The antitumor activity Cramoll 1,4 encapsulated in liposomes was tested against Sarcoma 180 in Swiss mice, demonstrating that the encapsulation enhances their antitumor activity and decreases tissue toxicity, particularly liver and kidney (Andrade et al., 2004). Cramoll 1,4 have strong bind to tumor cells, which have altered membrane carbohydrates. An example of cells that can be bind by these lectins are those originating from breast, uterus and brain tissues (Beltrão et al., 1998). It is able to bind to prostatic tissues, with good candidate for histochemical probe prostate pathologies (De Lima et al., 2010).

Cell death by apoptosis or necrosis may exhibit interaction with the mitochondria. Studies have reported that lectins such as BIL, MLL, PCL, ConA and POL, obtained from the respective species *Bothrops leucurus*, *Musca domestica*, *Polygonatum cyrtonema*, *Canavalia ensiformis* and *Polygonatum odoratum* are able to promote tumor cell death through mechanisms involving mitochondria (Aranda-Souza et al, 2014; Zhao et al., 2010; Liu et al, 2009a; Liu et al, 2009b; Liu et al, 2009c; Liu et al, 2009d). The MPT is a non-specific inner mitochondrial membrane permeabilization, triggered by mitochondrial calcium overload, release of mitochondrial ROS and may result in cell death (Kowaltowski et al., 2001; Maciel et al., 2001; Grijalba et al 1999; Kowaltowski & Vercesi, 1999; Castilho et al, 1995; Kowaltowski et al, 1995). Due to the involvement of MPT in cell death (Figueira et al., 2013), there is growing interest in natural compounds that modulate the opening of PTP, such as lectins. In this context, our aim was to investigate the biological effects, *in vitro*, of *C. mollis* lectins in human prostate adenocarcinoma cells (PC-3).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Lectin preparations

Seeds of *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean) were collected in the State of Pernambuco (Brazil) and seed extract (10% w/v prepared in 0.15 M NaCl) was fractionated using ammonium sulphate (40–60% w/v), and the fraction obtained was submitted to affinity chromatography in Sephadex G-75. Cramoll 1,4 preparation was selectively eluted with 0.3 M D-glucose in 0.15 M NaCl, dialysed against 0.15 M NaCl during 24 h and lyophilized (Correia & Coelho, 1995). The protein concentration was determined according to Lowry et al. (1951). rCramoll was obtained according to Varejão et al. (2010), by introducing a chemically synthesized DNA encoding the mature Cramoll 1 amino acid sequence into a bacterial expression vector. ConA was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) and used as experimental control.

2.2 Cell culture

PC-3 cells were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, USA) and grown in RPMI-1640 (Vitrocell, Brazil) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 µg/mL gentamycin, 100 IU/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Vitrocell, Brazil). The cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂.

2.3 Determination of ConA, Cramoll 1,4 or rCramoll effect on the PC-3 cells viability

Cell viability was determined by colorimetric assay using the reagent MTT. This assay is based on the ability of mitochondrial dehydrogenases have to reduce MTT to a purple water-insoluble salt. Cells were cultured in 24-well plates (7000 – 8000/cm²) and exposed for 24 h of treatment with lectins ConA, Cramoll 1,4 and rCramoll at concentrations ranging from 1 µg/mL and 300 µg/mL. After treatment, the

medium was aspirated and replaced with RPMI 1640 medium containing 1 mg/ml MTT in the absence of fetal bovine serum. The cells were incubated for 90 min at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. Then, was added sodium dodecyl sulfate (SDS) to each well, until complete solubilization of the formazan generated. Reading the absorbance was at 570-650 nm using on spectrophotometer (Bio-Rad, USA). A dose x response curve was constructed and cell viability was expressed as a percentage relative to controls (Sylvester, 2011). This same test was performed to evaluate the viability of cells treated with 50 µg/ml of lectins as a function of time in hours.

2.4 Analysis of PC-3 cells death by flow cytometry after Cramoll 1,4 or rCramoll treatment

Cells were cultured in 6-well plates (7000 – 8000/cm²) and exposed to 50 µg/mL of Cramoll 1,4 or rCramoll for 4 h. For the analysis, 10⁶ cells were incubated in binding buffer (10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, and 1.8 mM CaCl₂) and annexin V conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC) (1:500, Invitrogen, USA) and propidium iodide (PI, 20 µg/ml; Molecular Probes, USA) were added to each labelled cytometer tube. The tubes were maintained at room temperature for 20 min in the dark. Flow cytometry was performed in a FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences, USA) equipped with an argon laser and analysed using CellQuest software (version 4.1). Ten thousand events were acquired and result analysis was performed in graphs by dot plot. AV⁻/PI⁺ cells were considered necrotic cells and AV⁺/PI⁻ represented cells in the early stage of apoptosis. Double negatives were considered viable cells.

This assay was also performed to assess whether the PC-3 cell death was blocked after exposure of the cells to compounds capable to inhibit the MPT. They were used 1 µM Debio 025, an analogue of CsA (Quarato et al., 2012), which binds to component a PTP protein called cyclophilin; and 1 µM boncrecato, which binds to the adenine nucleotide translocator (ANT). These inhibitors were added to the cell culture approximately 30 minutes before treatment the cells with lectins. After 4 h, the

cell death assay was performed similarly to that described above. However, this time the cells were labeled only with PI and quantified by flow cytometry.

2.5 Estimates of levels of mitochondrial superoxide after Cramoll 1,4 or rCramoll lectins treatment

ROS production, mainly superoxide ($O_2^{\cdot-}$), was measured by flow cytometry using the MitoSox Red (Molecular Probes, USA), a highly selective fluorescent probe for the detection of ROS generated within mitochondria. Cells were cultured in 6-well plates ($7000 - 8000/cm^2$) and exposed to $50 \mu g/mL$ of Cramoll 1,4 or rCramoll for 2 h. After the treatment with lectins, PC-3 cells (10^6 cells/mL) were preincubated in RPMI 1640 medium containing $5 \mu M$ MitoSox Red, at $37^\circ C$ in a humidified CO_2 incubator (5%) for 10 min. The cells were then washed with PBS. Fluorescence intensity was analyzed using a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences, USA) with excitation at 488 nm and emission at 620 nm. A minimum of ten thousand events were collected. Results were presented as single-parameter histograms of cellular counts versus fluorescence intensity.

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

After the treatment of PC-3 cells with $50 \mu g/mL$ of Cramoll 1,4 or rCramoll for 30 min, 10^6 cells were washed twice at 1600 rpm for 5 min in PBS containing 11 mM glucose and 0.8 mM $MgSO_4$, pH 7.2. Cells were resuspended in PBS containing 11 mM glucose and 0.8 mM $MgSO_4$, pH 7.2., and $5 \mu M$ Fura 2-AM (Sigma-Aldrich, USA). The suspensions were incubated for 45 min and maintained at $37^\circ C$ in a humidified atmosphere with 5% CO_2 . Subsequently, the cells were washed with PBS to remove extracellular dye. Cells were resuspended to a final density of 10^6 cells/mL in PBS. For fluorescence measurements, 10^6 cells/mL were diluted into PBS in a cuvette placed into a thermostatically regulated ($37^\circ C$) F-7000 Hitachi spectrofluorimeter (Hitachi, Japan). Excitation was at 340 nm and 380 nm and emission was at 510 nm. Calibration was performed at the end of each experiment.

2.7 Determination of mitochondrial membrane potential

The mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) was estimated in PC-3 cells permeabilized with digitonin by safranin O the fluorescence changes, using an F-7000 spectrofluorimeter (Hitachi, Japan) operating at the wavelengths of excitation and emission 495 nm and 586 nm, respectively. The indicator safranin O binds to energized mitochondria membranes, which causes a change in their fluorescence in amplitude proportional to values of approximately 170 mV-180 mV (Akerman & Wiström, 1976). After 30 min treatment with 50 µg/mL of Cramoll 1,4, PC-3 cells were trypsinized using 0.25% trypsin and 0.03% EDTA (Vitrocell, Brazil), resuspended in assay medium (125 mM sucrose, 65 mM KCl (pH 7.2), 10 mM HEPES, 2 mM K_2HPO_4 , 1 mM $MgCl_2$) containing the probe safranin O 5 µM, 20 µM EGTA (Sigma-Aldrich, USA) and 0.5 mM from a pool of respiratory substrates S1 (α -ketoglutarate, glutamate, malate and pyruvate) and 20 µM digitonin. 300 µM ADP was added to observe cellular respiration and phosphorylation to ATP, which was reversed with 2.5 µM carboxyatractyloside (CAT). 20 µM calcium was added to promote mitochondrial permeability transition. During the experiments the samples were maintained under constant stirring at 37°C. 1 µM FCCP was used to dissipate the $\Delta\Psi_m$ and allow comparison of the differences in amplitude between $\Delta\Psi_m$ of control and treated cells.

2.8 Statistical analysis

All tests were performed in at least three independent experiments. The concentration needed to kill 50% of cells (EC_{50}) was estimated graphically by non-linear regression analysis. Other data were plotted as mean values of groups $\pm$ standard error mean (S.E.M) and were analyzed considering the value of $p < 0.05$ as statistically significant. Statistical significance was determined by One-Way Analysis of Variance (ANOVA) with Tukey's post-tests analysis, Two-Way ANOVA with Bonferroni's post-tests analysis and the differences between the groups were analyzed using Student's t-test. For statistical analysis was used GraphPad Prism 5[®] software.

3. RESULTS

3.1 Lectins reduce PC-3 cells viability according to the concentration or treatment time

Figure 1 shows a progressive decrease in the PC-3 cells viability with the increase of ConA, Cramoll 1,4 and rCramoll concentrations. Cramoll 1,4 and rCramoll have higher toxicity compared to the lectin ConA. ConA, Cramoll 1,4 and rCramoll reduced significantly the viability of PC-3 cells from a concentration of 30 µg/mL, rCramoll was the most active, reducing the viability cell in $46.25 \pm 1.29\%$ ($P < 0.002$). Using a linear regression graph, it was possible to determine the concentration values able to kill 50% of treated cells (Figure 2). Viability was reduced according to the treatment time. Cramoll 1,4 and rCramoll caused decreased in viability of PC-3 cells after 2 h of treatment (Figure 3).

3.2 Cramoll 1,4 or rCramoll induces necrosis in PC-3 cells

Flow cytometry analysis after exposure of PC-3 cells for 4 h to Cramoll 1,4 or rCramoll at 50 µg/ml revealed that these lectins induce cell death by necrosis. The ratio of PI⁺ cells to total number of cells was $46.27 \pm 2.19\%$ and $51.94 \pm 3.19\%$, ($P < 0.001$) for Cramoll 1,4 and rCramoll, respectively (Figure 4).

3.3 Cramoll 1,4 or rCramoll increases both calcium cytosolic and mitochondrial superoxide anion levels in PC-3 cells

In order to study the mechanisms of action involved in PC-3 cell death caused by Cramoll 1,4 or rCramoll, we determined the levels of mitochondrial superoxide anions and cytosolic calcium after short period of incubation. Exposure to lectins cause increase in about three-fold in the levels of mitochondrial superoxide (Figure 5), while

the ratio of fluorescence at wavelengths of 340 nm and 380 nm in the assay of cytosolic calcium release increased in about two-fold (Figure 6).

3.4 MPT inhibitors doesn't prevent cell death and lectins causes death by necrosis, probably, due to decrease in oxidative phosphorylation

To assess whether the MPT was involved in the necrotic process induced by lectins, PC-3 cells were exposed to Cramoll 1,4 or rCramoll for 4 h in the presence of MPT inhibitors. The analysis by flow cytometry demonstrated that the cell death induced by lectins continued to occur and there was not statistically significant difference between the number of inviable cells in the presence or absence of inhibitors MPT (Figure 7).

Figure 8 shows that PC-3 cells exposed to Debio 025 showed partial protection against cell death, as this MPT inhibitor conferred a higher capacity for retention of the mitochondrial membrane potential after addition of 20 μ M of calcium ions. Cells treated with Cramoll 1,4 died by necrosis, probably because they have a reduced oxidative phosphorylation, culminating in an ATP deficiency. This indicates that occurs a small MPT, but the presence of the inhibitor was not sufficient to protect against cell death.

4. DISCUSSION

This study demonstrates that Cramoll 1,4 and rCramoll lectins are able to cause the death of human prostate adenocarcinoma cells (PC-3) by necrosis with higher cytotoxicity compared to the lectin ConA. Previous studies report that lectins can differentiate normal cells from tumor cells (Sabova et al., 2010) because the tumor cells have an altered pattern of glycosylation in the membrane (Nolte et al., 2012; Sharon et al., 2007). Recent data indicate that the lectin BIL preferably causes death by necrosis of melanoma cells than non-tumor cells (Aranda-Souza et al., 2014).

Cramoll 1,4 and rCramoll can recognize glycoconjugates on the surface of PC-3 cells membranes, leading to cell agglutination. According to previous data, Cramoll 1,4 is able to bind to membrane glycoproteins present in *T. cruzi* epimastigotes and then is internalized, being located in the mitochondria (Fernandes et al., 2014). In *T. cruzi*, the cytotoxicity of Cramoll 1,4 is due to increased cytosolic Ca^{2+} concentration followed by a mitochondrial Ca^{2+} overload and ROS production, resulting in necrosis (Fernandes et al., 2010). Evidence shows that mitochondrial calcium homeostasis plays important roles in various cellular processes, including the cell death (Giorgi et al., 2008; Giacomello et al., 2007). This calcium homeostasis may trigger the generation of ROS and, consequently, the death of cells through the MPT pore opening (Figueira et al., 2013).

Exposure of PC-3 cells to Cramoll 1,4 and rCramoll promoted increase in mitochondrial superoxide generation and increase in cytosolic calcium levels, signs that precede cell death. Thus, it was not possible to determine what is the primary cause of death (increase of Ca^{2+} levels or generation of ROS). These data are similar to those presented by Aranda-Souza et al. (2014), where the lectin BIL was able to cause necrosis in B16-F10 cells by increasing ROS and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$, with the involvement of mitochondria via the Ca^{2+} overload, MPT pore opening.

In this regard, MPT inhibitors, such as Debio 025 and bongkreikic acid, are used in order to evaluate the involvement of MPT in cell death. The Debio 025 is an analog of the immunosuppressant cyclosporin A (CsA). Submicromolar concentrations of the CsA is capable of inhibiting MPT (Broekemeier, 1989; Crompton, 1988), probably due to binding to cyclophilins at the inner mitochondrial membrane (Nicolli 1996; Connern, 1994). The MPT depends on the presence of Ca^{2+} in intramitochondrial space and membrane proteins such as cyclophilins, which changes their conformation facilitating the opening of the MPT pore. MPT can be stimulated by a series of compounds known as inductors, such as inorganic phosphate, oxidizing of pyridine nucleotides (Vercesi et al., 1997), protonophore (Bernardi, 1992) and dithiolics reagents (Bernardes et al., 1994). These inductors are able to increase the mitochondrial oxidative stress induced by Ca^{2+} . The difference between Debio 025 and CsA is that the latter can inhibit calcineurin (Quarato et al., 2012), which has been extensively studied in cell death processes by apoptosis or necrosis (Cheng et al., 2012; Iwai-Kanai & Hasegawa, 2004; Wang et al., 1999). The bongkreikic acid

inhibits the MPT pore opening by binding ANT channel (Halestrap et al., 2002). Both inhibitors, Debio 025 or bongkreikic acid, were not able to protect the cells against death caused by Cramoll 1,4, with a reduction in oxidative phosphorylation and, subsequent, deprivation of ATP.

However, it was noted that PC-3 cells exposed to Debio 025 and, subsequently, treated with Cramoll 1,4 had a higher retention capacity of membrane potential after the addition of calcium ion, suggesting that Debio 025 confers partial protection these cells, although not sufficient to keep them alive. The permeabilization followed by an influx of calcium ions and calcium overload within the mitochondria, favors the generation of ROS (Irigoien et al., 2009). This calcium overload is also able to change the organization of mitochondrial membrane, which affects the respiratory chain and leads to oxidative damage, resulting in cell death (Figueira et al., 2013; Grijalba et al., 1999).

5. CONCLUSIONS

The increasing number of biological activities presented by plants lectins has been investigated over the years and, several experimental models are used in the search for substances with lower toxic effects in normal cells but exhibit cytotoxicity in cells with altered glycosylation membrane pattern. These substances may help in the treatment of pathologies such as cancer. The results from this work indicate that Cramoll 1,4 or rCramoll are able to cause the death of PC-3 cells quickly by necrosis. Cell death is probably triggered by an increase in cytosolic calcium and release of mitochondrial superoxide, resulting in a poor oxidative phosphorylation and small energy production.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do

estado de Pernambuco (FACEPE, AMD-0156-2.00/12) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERENCES

- Akerman, K.E., Wikstrom, M.K., 1976. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Lett* 68, 191-197.
- Andrade, C.A.S., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Nascimento, S.C., Santos-Magalhães, N.S., 2004. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. *International Journal of Pharmaceutics* 278, 435-445.
- Aranda-Souza, M.A., Rossato, F.A., Costa, R.A.P., Figueira, T.R., Castilho, R.F., Guarniere, M.C., Nunes, E.S., Coelho, L.C.B.B., Correia, M.T.S., Vercesi, A.E., 2014. A lectin from *Bothrops leucurus* snake venom raises cytosolic calcium levels and promotes B16-F10 melanoma necrotic cell death via mitochondrial permeability transition. *Toxicon* 82, 97-103.
- Beltrão, E.I., Correia, M.T., Figueredo-Silva, J., Coelho, L.C., 1998. Binding evaluation of Isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 74, 125-134.
- Bernardes, C.F., Meyer-Fernandes, J., Basseres, D.S., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 1994. Ca^{2+} -dependent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1188, 93-100.
- Bernardi, P., 1992. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. *Journal of Biological Chemistry* 267, 8834-8839.
- Broekemeier, K.M., Dempsey, M.E., Pfeiffer, D.R., 1989. Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 264, 7826-7830.
- Castilho, R.F., Kowaltowski, A.J., Meinicke, A., Bechara, E.J.H., Vercesi, A.E., 1995. Permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca^{2+} ions is

stimulated by t-butyl hydroperoxide and mediated by reactive oxygen species generated by mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine* 18, 479-486.

Cheng, J., Tang, W., Su, Z., Guo, J., Tong, L., Wei, Q., 2012. Calcineurin subunit B promotes TNF- α -induced apoptosis by binding to mitochondria and causing mitochondrial Ca^{2+} overload. *Cancer Letters* 321, 169-178.

Connern, C.P., Halestrap, A.P., 1994. Recruitment of mitochondrial cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of a calcium-sensitive non-specific channel. *Biochemical Journal* 302, 321-324.

Correia, M.S., Coelho, L.B.B., 1995. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* mart. (Camaratu Bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 55, 261-273.

Crompton, M., Ellinger, H., Costi, A., 1988. Inhibition by cyclosporin A of a Ca^{2+} -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochemical Journal* 255, 357-360.

de Lima, A.L.R., Cavalcanti, C.C.B., Silva, M.C.C., Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., Beltrão, E.I.C., Correia, M.T.d.S., 2010. Histochemical Evaluation of Human Prostatic Tissues with *Cratylia mollis* Seed Lectin. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010, 6.

de Melo, C., Paim, B., Zecchin, K., Morari, J., Chiaratti, M., Correia, M., Barroso Coelho, L., Paiva, P., 2010a. Cramoll 1,4 lectin increases ROS production, calcium levels, and cytokine expression in treated spleen cells of rats. *Mol Cell Biochem* 342, 163-169.

de Melo, C.M.L., de Castro, M.C.A.B., de Oliveira, A.P., Gomes, F.O.S., Pereira, V.R.A., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Paiva, P.M.G., 2010b. Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. *Phytotherapy Research* 24, 1631-1636.

de Melo, C.M.L., Melo, H., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., da Silva, M.B., Pereira, V.R.A., 2011. Mitogenic Response and Cytokine Production Induced by Cramoll 1,4 Lectin in Splenocytes of Inoculated Mice. *Scandinavian Journal of Immunology* 73, 112-121.

de Oliveira, P.S.S., go, M.J.B.d.M., da Silva, R.R., Cavalcanti, M.B., Galdino, S.L., Correia, M.T.d.S., Coelho, L.C.B.B., Pitta, M.G.d.R., 2013. *Cratylia mollis* 1,4

Lectin: A New Biotechnological Tool in IL-6, IL-17A, IL-22, and IL-23 Induction and Generation of Immunological Memory. *BioMed Research International* 2013, 6.

Fernandes, M.P., Inada, N.M., Chiaratti, M.R., Araújo, F.F.B., Meirelles, F.V., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Alves, M.J.M., Gadelha, F.R., Vercesi, A.E., 2010. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin. *J Bioenerg Biomembr* 42, 69-78.

Fernandes, M.P., Leite, A.C.R., Araújo, F.F.B., Saad, S.T.O., Baratti, M.O., Correia, M.T.S., Coelho, L.C.B.B., Gadelha, F.R., Vercesi, A.E., 2014. The *Cratylia mollis* Seed Lectin Induces Membrane Permeability Transition in Isolated Rat Liver Mitochondria and a Cyclosporine A-Insensitive Permeability Transition in *Trypanosoma cruzi* Mitochondria. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 61, 381-388.

Figueira, T.R., Barros, M.H., Camargo, A.A., Castilho, R.F., Ferreira, J.C.B., Kowaltowski, A.J., Sluse, F.E., Souza-Pinto, N.C., Vercesi, A.E., 2013. Mitochondria as a Source of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: From Molecular Mechanisms to Human Health. *Antioxidants & Redox Signaling* 18, 2029-2074.

Giacomello, M., Drago, I., Pizzo, P., Pozzan, T., 2007. Mitochondrial Ca^{2+} as a key regulator of cell life and death. *Cell Death Differ* 14, 1267-1274.

Giorgi, C., Romagnoli, A., Pinton, P., Rizzuto, R., 2008. Ca^{2+} signaling, mitochondria and cell death. *Curr Mol Med* 8, 119-130.

Grijalba, M.T., Vercesi, A.E., Schreier, S., 1999. Ca^{2+} -Induced Increased Lipid Packing and Domain Formation in Submitochondrial Particles. A Possible Early Step in the Mechanism of Ca^{2+} -Stimulated Generation of Reactive Oxygen Species by the Respiratory Chain. *Biochemistry* 38, 13279-13287.

Halestrap, A.P., McStay, G.P., Clarke, S.J., 2002. The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* 84, 153-166.

Irigoin, F., Inada, N.M., Fernandes, M.P., Piacenza, L., Gadelha, F.R., Vercesi, A.E., Radi, R., 2009. Mitochondrial calcium overload triggers complement-dependent superoxide-mediated programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 418, 595-604.

- Iwai-Kanai, E., Hasegawa, K., 2004. Intracellular signaling pathways for norepinephrine- and endothelin-1-mediated regulation of myocardial cell apoptosis. *Mol Cell Biochem* 259, 163-168.
- Konozy, E.H.E., Bernardes, E.S., Rosa, C., Faca, V., Greene, L.J., Ward, R.J., 2003. Isolation, purification, and physicochemical characterization of a d-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 410, 222-229.
- Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 1995. Ca²⁺-induced mitochondrial membrane permeabilization: role of coenzyme Q redox state. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 269, 141-147.
- Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E., 1999. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 463-471.
- Kowaltowski, A.J., Castilho, R.F., Vercesi, A.E., 2001. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Letters* 495, 12-15.
- Liu, B., Cheng, Y., Bian, H.-j., Bao, J.-k., 2009a. Molecular mechanisms of *Polygonatum cyrtonema* lectin-induced apoptosis and autophagy in cancer cells. *Autophagy* 5, 253-255.
- Liu, B., Cheng, Y., Zhang, B., Bian, H.-j., Bao, J.-k., 2009b. *Polygonatum cyrtonema* lectin induces apoptosis and autophagy in human melanoma A375 cells through a mitochondria-mediated ROS-p38-p53 pathway. *Cancer Letters* 275, 54-60.
- Liu, B., Li, C.-y., Bian, H.-j., Min, M.-w., Chen, L.-f., Bao, J.-k., 2009c. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 482, 1-6.
- Liu, B., Zhang, B., Min, M.-w., Bian, H.-j., Chen, L.-f., Liu, Q., Bao, J.-k., 2009d. Induction of apoptosis by *Polygonatum odoratum* lectin and its molecular mechanisms in murine fibrosarcoma L929 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1790, 840-844.
- Liu, B., Bian, H.-j., Bao, J.-k., 2010. Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Letters* 287, 1-12.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Maciel, E.N., Vercesi, A.E., Castilho, R.F., 2001. Oxidative stress in Ca^{2+} -induced membrane permeability transition in brain mitochondria. *Journal of Neurochemistry* 79, 1237-1245.
- Maciel, E.V.M., Araújo-Filho, V.S., Nakazawa, M., Gomes, Y.M., Coelho, L.C.B.B., Correia, M.T.S., 2004. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals* 32, 57-60.
- Nicolli, A., Basso, E., Petronilli, V., Wenger, R.M., Bernardi, P., 1996. Interactions of Cyclophilin with the Mitochondrial Inner Membrane and Regulation of the Permeability Transition Pore, a Cyclosporin A-sensitive Channel. *Journal of Biological Chemistry* 271, 2185-2192.
- Nolte, S., de Castro Damasio, D., Baréa, A.C., Gomes, J., Magalhães, A., Mello Zischler, L.F.C., Stuelp-Campelo, P.M., Elíbio-Esposito, S.L., Roque-Barreira, M.C., Reis, C.A., Moreno-Amaral, A.N., 2012. 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* 59, 81-85.
- Paiva, P.M.G., Coelho, L.C.B.B., 1992. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* mart. (camaratu bean). *Applied Biochemistry and Biotechnology* 36, 113-118.
- Peumans, W.J., Van Damme, E.J., 1995. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology* 109, 347-352.
- Peumans, W.J., Van Damme, E.J., 1998. Plant lectins: specific tools for the identification, isolation, and characterization of O-linked glycans. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 33, 209-258.
- Peumans, W., van Damme, J.M., Barre, A., Rougé, P., 2001. Classification of Plant Lectins in Families Of Structurally and Evolutionary Related Proteins, in: Wu, A. (Ed.), *The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates* —2. Springer US, pp. 27-54.

- Quarato, G., D'Aprile, A., Gavillet, B., Vuagniaux, G., Moradpour, D., Capitanio, N., Piccoli, C., 2012. The cyclophilin inhibitor alisporivir prevents hepatitis C virus-mediated mitochondrial dysfunction. *Hepatology* 55, 1333-1343.
- Sabová, L., Pilátová, M., Szilagyi, K., Sabo, R., Mojžiš, J., 2010. Cytotoxic effect of mistletoe (*Viscum album* L.) extract on Jurkat cells and its interaction with doxorubicin. *Phytotherapy Research* 24, 365-368.
- Sharon, N., Lis, H., 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14, 53-62.
- Sharon, N., 2007. Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules. *Journal of Biological Chemistry* 282, 2753-2764.
- Sharon, N., 2007. Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules. *Journal of Biological Chemistry* 282, 2753-2764.
- Sylvester, P., 2011. Optimization of the Tetrazolium Dye (MTT) Colorimetric Assay for Cellular Growth and Viability, in: Satyanarayanajois, S.D. (Ed.), *Drug Design and Discovery*. Humana Press, pp. 157-168.
- Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Barre, A., Rougé, P., 1998. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. *Critical Reviews in Plant Sciences* 17, 575-692.
- Varejão, N., Almeida, M.d.S., De Cicco, N.N.T., Atella, G.C., Coelho, L.C.B.B., Correia, M.T.S., Foguel, D., 2010. Heterologous expression and purification of a biologically active legume lectin from *Cratylia mollis* seeds (CRAMOLL 1). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1804, 1917-1924.
- Vercesi, A.E., Kowaltowski, A.J., Grijalba, M.T., Meinicke, A.R., Castilho, R.F., 1997. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosci Rep* 17, 43-52.
- Wang, H.G., Pathan, N., Ethell, I.M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T.F., Reed, J.C., 1999. Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284, 339-343.

Zhao, Q., Cao, X., Zeng, B., Wang, C., Yan, L., Xu, C., 2010. *Musca domestica* larva lectin induces apoptosis in BEL-7402 cells through a mitochondria-mediated reactive oxygen species way. Biol Pharm Bull 33, 1274-1278.

PC-3 cells

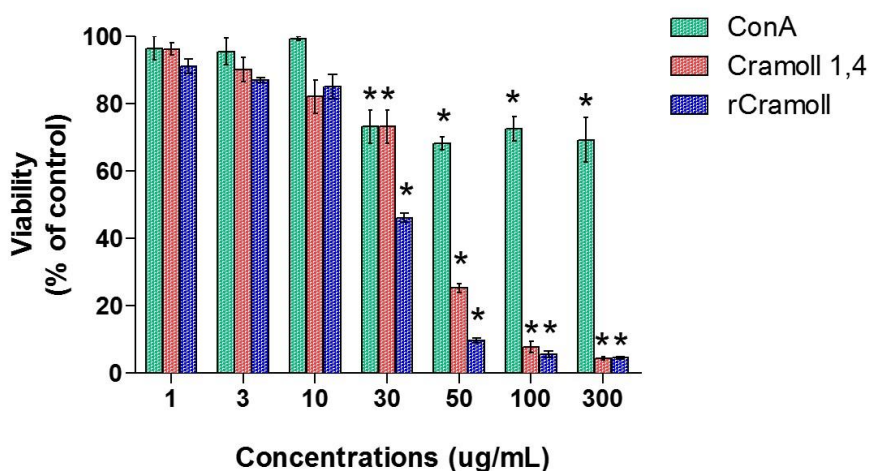


Figure 1: ConA, Cramoll 1,4 and rCramoll reduce PC-3 cells viability. PC-3 cells were treated with varying concentrations of ConA, Cramoll 1,4 or rCramoll for 24h; cell viability was determined using MTT (1 mg/mL). The values represent the mean $\pm$ S.E.M of at least three independent experiments. *Significantly different from the respective control at $P < 0.002$, Student's t -test.

PC-3 cells

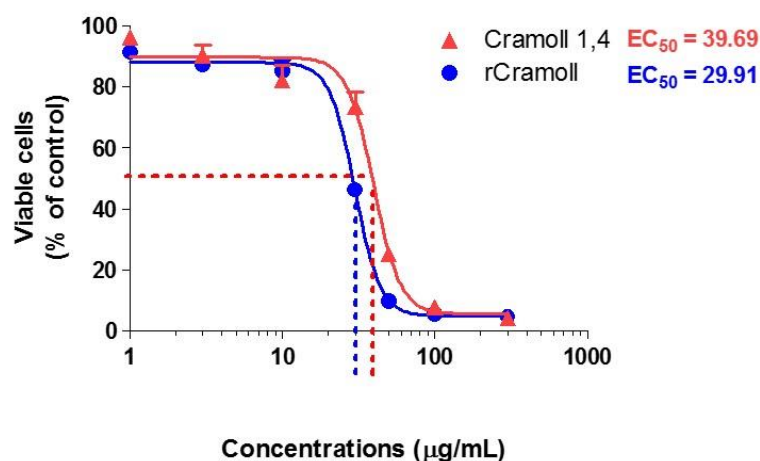


Figure 2: Cramoll 1,4 or rCramoll decreases PC-3 cells viability according to the concentration. Dose-response curve of PC-3 cells after 24 h treatment with varying concentrations of Cramoll 1,4 or rCramoll lectins. The cell viability was determined using MTT (1 mg/mL).

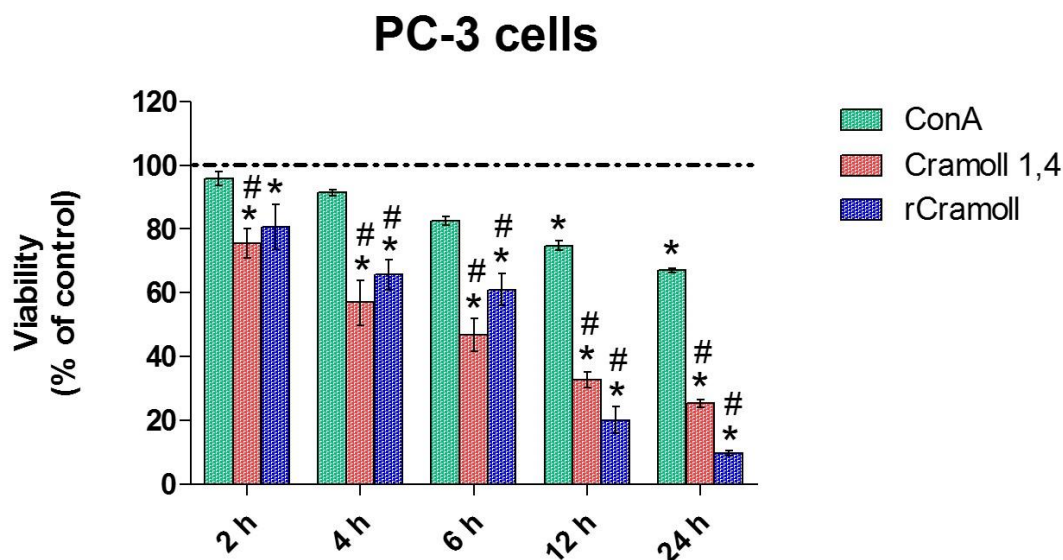


Figure 3: Lectins decrease cell viability according to the treatment time. PC-3 cells were treated with ConA, Cramoll 1,4 or rCramoll lectins, in function of time, in hours. The cell viability was determined using MTT (1 mg/mL), after treatment with 50 μ g/mL of the respective lectins. Values are the means $\pm$ S.E.M. of at least three independent experiments. * $P < 0.05$: ConA, Cramoll 1,4 or rCramoll versus Control in respective time; # $P < 0.05$: Cramoll 1,4 or rCramoll versus ConA in respective time. Two-Way Analysis of Variance with Bonferroni's post-tests analysis.

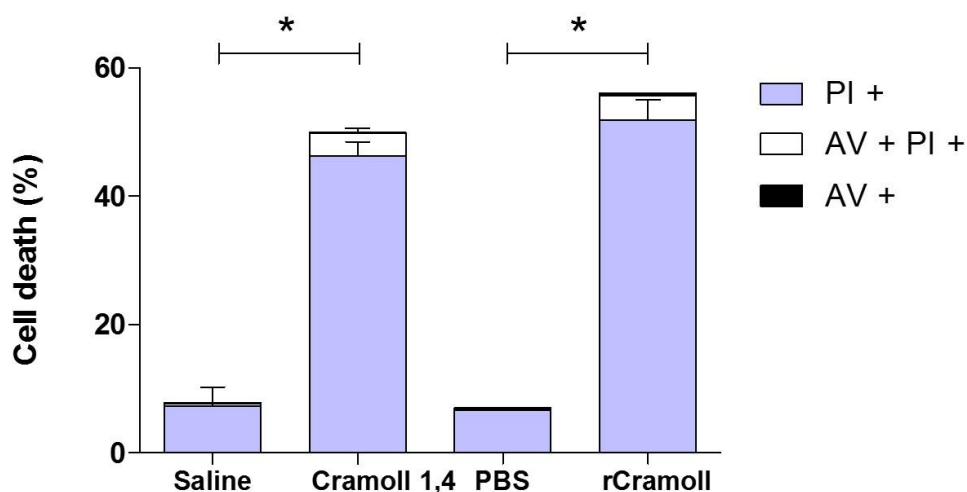


Figure 4: Cramoll 1,4 or rCramoll induces necrosis in PC-3 cells. PC-3 human prostatic tumor cells were treated with 50 μ g/mL of Cramoll 1,4 or rCramoll for 4 h. The percentages of necrotic (PI +) or apoptotic (AV +) cells were determined using flow cytometry after Annexin V-FITC and propidium iodide staining. * Significantly different from the respective control relative to necrosis at $P < 0,001$, Two-Way Analysis of Variance with Bonferroni's post-tests analysis.

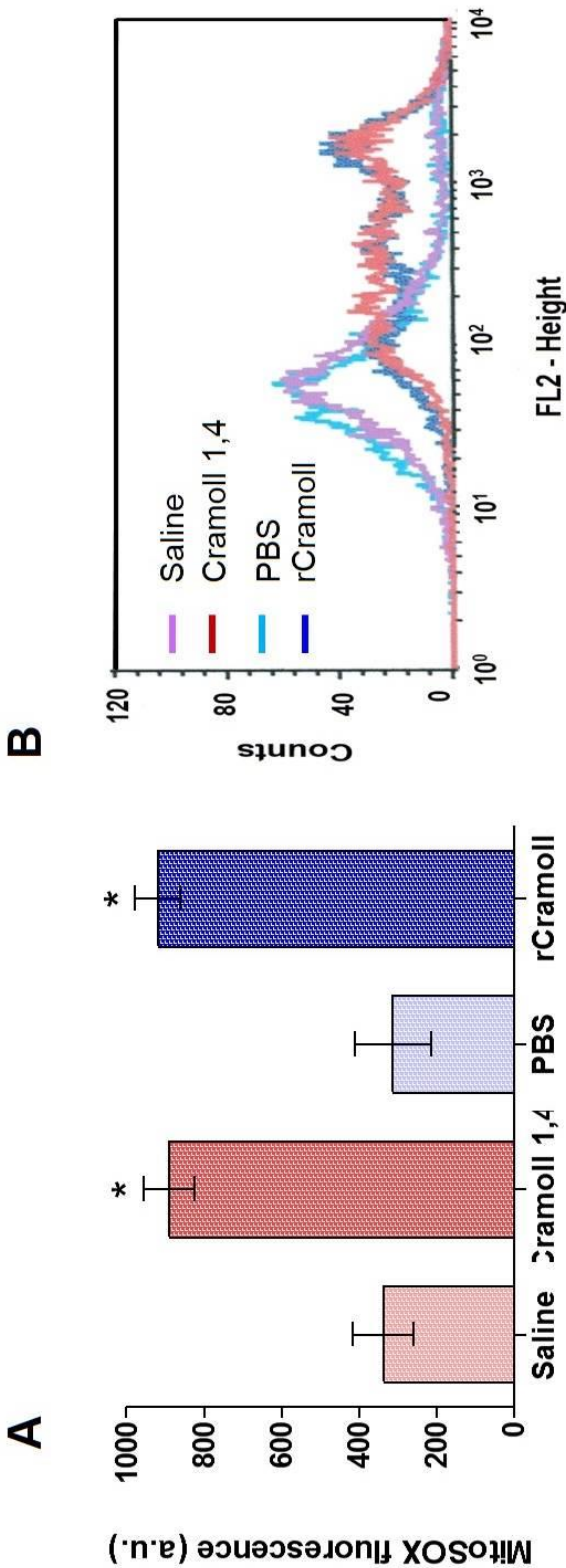


Figure 5: Cramoll 1,4 or rCramoll increases mitochondrial superoxide levels in PC-3 cells. Following 2 h of treatment with Cramoll 1,4 or rCramoll, cells were incubated with 5 μ M MitoSOX at 37° C for 10 min. Superoxide levels were then analyzed by flow cytometry. A: Relative extent of increase mitochondrial superoxide. B: Representative traces of flow cytometry analysis. Values are the means $\pm$ S.E.M of four independent experiments. *Significantly different from control at $P < 0,01$, One-Way Analysis of Variance with Tukey's post-tests analysis. a.u., arbitrary units.

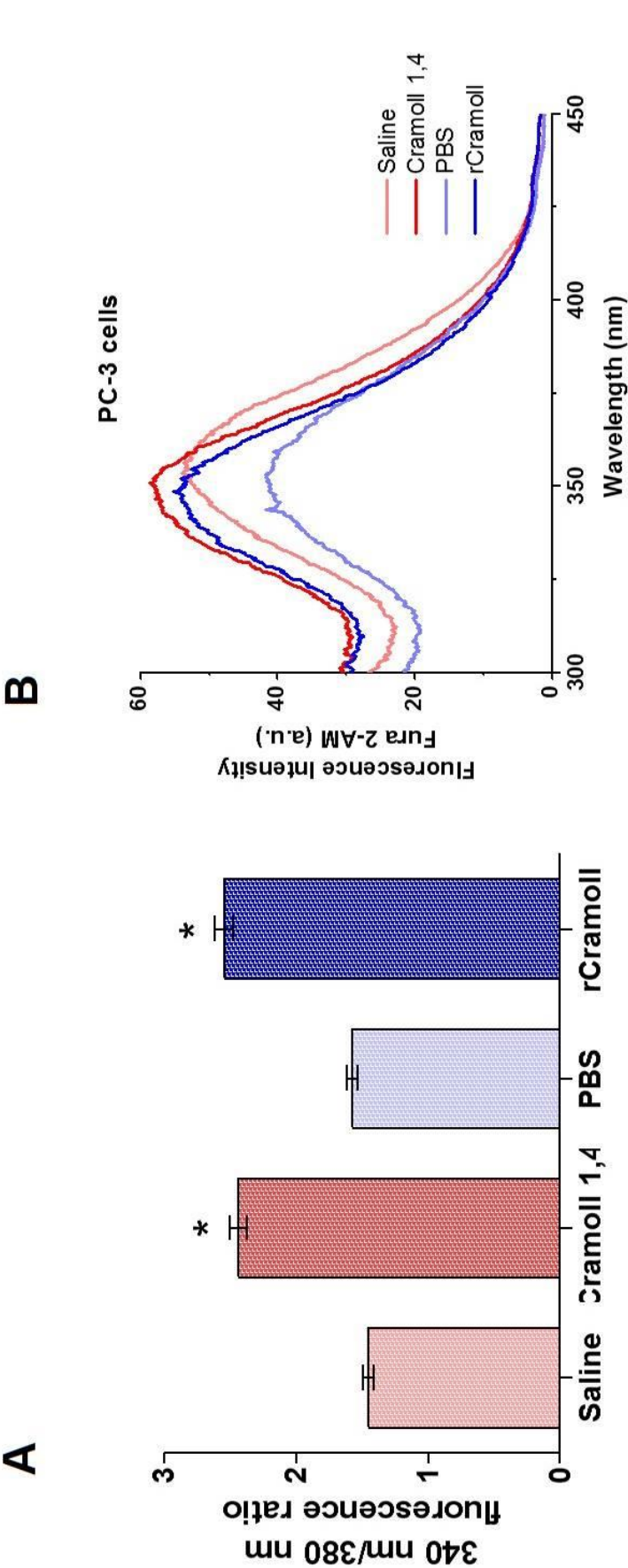


Figure 6: Treatment with Cramoll 1,4 or rCramoll (50 µg/mL) increases 340 nm/380 nm fluorescence ratio in PC-3 human prostatic tumor cells. In A, PC-3 cells were treated with Cramoll 1,4 ou rCramoll for 30 min and then probed with 5 µM Fura 2-AM (Sigma-Aldrich) to measure cytosolic Ca²⁺ levels. In B, representative traces of seven independent experiments. Values are the means ± S.E.M. *Significantly different from control at $P < 0.0001$, One-Way Analysis of Variance with Tukey's post-tests analysis. a.u., arbitrary units.

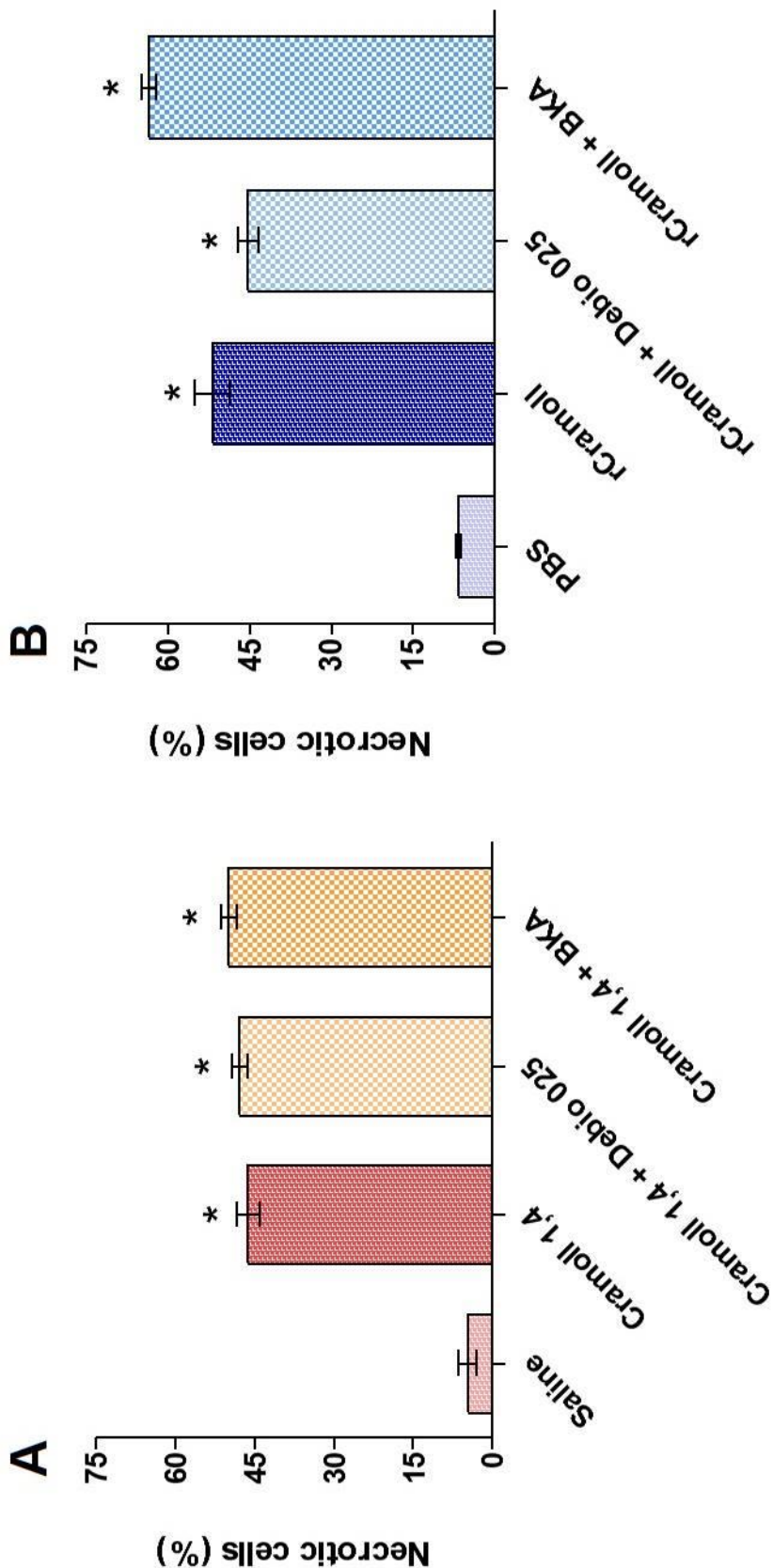


Figure 7: PC-3 human prostatic tumor cells death induced by Cramoll 1,4 or rCramoll can't be blunted by treatment with the MPT inhibitors Debio 025 and bongkreic acid. PC-3 cells were treated with Cramoll 1,4 (A) or rCramoll (B) for 4 h in the presence or absence of or 1 μ M Debio 025 or 1 μ M bongkreic acid (BKA). Cell death was assessed by flow cytometry analysis of propidium iodide (Sigma-Aldrich). In A and B, the values are expressed as the means $\pm$ S.E.M of four independent experiments for each condition. * $P < 0.01$ versus control cells. One-Way Analysis of Variance with Tukey's post-tests analysis.

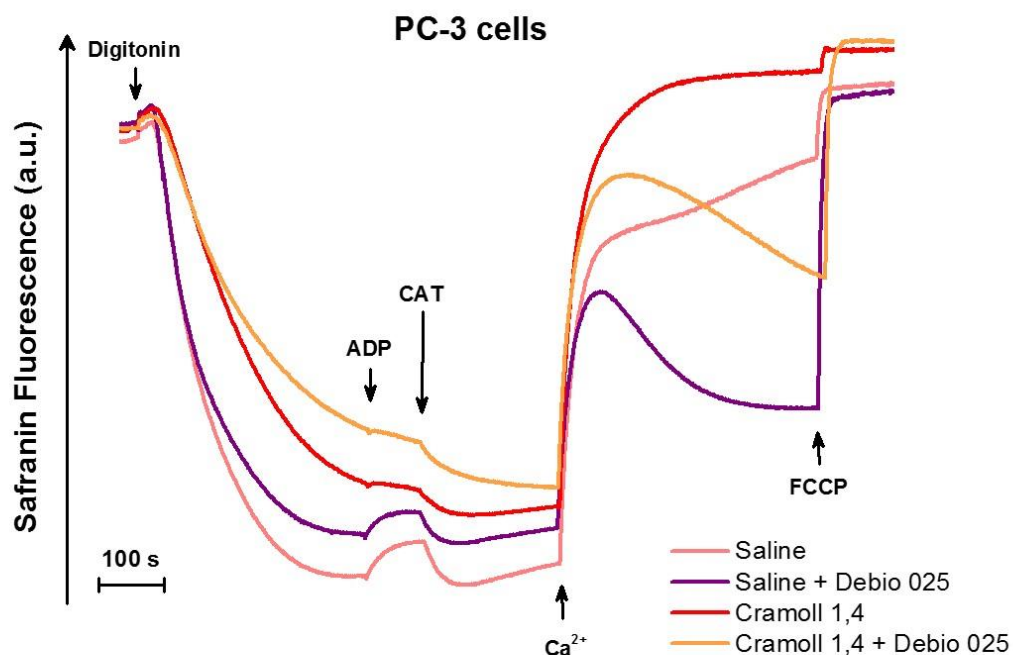


Figure 8: Lectin causes death by necrosis, probably, due to a large decrease in oxidative phosphorylation. PC-3 cells were treated with 50 $\mu\text{g/mL}$ Cramoll 1,4 for 30 minutes; then, approximately 1×10^6 viable cells/mL were permeabilized with 20 μM digitonin. $\Delta\Psi\text{m}$ was estimated by safranin fluorescence. The arrows indicate the addition of 20 μM digitonin, 300 μM ADP, 2,5 μM carboxyatractyloside (CAT), 20 μM calcium ions and 1 μM FCCP. Representative traces of at least three independent experiments. a.u., arbitrary units.

4.3 MANUSCRITO 3

Evaluation of platelet agglutination activity of molecular forms from *Cratylia mollis* seed lectin

Figueirôa, E.O.^a; Paula, R.A.^a; Rezende-Neto, J.M.^a; Paiva, P.M.G.^a; Coelho, L.C.B.B.^a; Correia, M.T.S.^a

^a Departament of Biochemistry, Center of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco, CEP 50670-420, Recife, PE, Brazil

* Corresponding author. Tel.: +55 81 21268540; fax: +55 81 21268576. E-mail address: mtscorreia@gmail.com (M.T.S. Correia)

ABSTRACT

Cratylia mollis seed lectin (Cramoll) contains molecular forms (Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 and Cramoll 4), which have previously been highly purified. The effects on platelet agglutination induction and inhibition of Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 and Cramoll 4 were analyzed and compared with wheat germ agglutinin (WGA) and concanavalin A (ConA), two lectins that induce platelet agglutination. The lectins were assayed with platelets from different types of human blood and rabbit platelets. Results obtained in this study showed that isoforms of *C. mollis* despite performing the same specificity for carbohydrates, exception for Cramoll 3, human platelets agglutinated from different blood types and rabbit platelets. Agglutination inhibition test with lectin-specific carbohydrates only decreased the percentage of agglutination, demonstrating the connection between lectins and membrane carbohydrates present in platelets, probably occurred through hydrophobic interactions or of another nature.

Keywords: *Cratylia mollis* lectin, platelets, platelet agglutination, inhibition of platelet agglutination.

1. INTRODUCTION

Lectins are proteins or glycoproteins from non-immunologic origin that recognize carbohydrate structures selectively and reversibly. The main feature of this class of proteins is the ability to interact with carbohydrates and therefore bind to glycoconjugates from cell and tissue surfaces; these proteins promote erythrocyte and tumor cells agglutination [1]. Due to these properties, lectins have been studied in order to investigate membrane structure of platelets or other cells [2]. *Cratylia mollis* (camaratu bean) is a plant native to semi-arid Region in the state of Pernambuco, Brazil. From the seeds of *C. mollis* were isolated multiple molecular forms of lectins, known as isolectins, called Cramoll 1, Cramoll 2 and Cramoll 4, which are specific for glucose/mannose, and Cramoll 3 which is galactose specific [3] [4].

Evidences showed that the binding between the lectin and the receptor are prerequisites for various effects in cells. However, it has been suggested that one of the reasons for the lectin/cell reactions different is the localization of their receptors, specifically carbohydrates, localized on membrane glycoproteins [5].

Studies on lectin effects on platelet functions have shown that some of them are able to stimulate platelet aggregation [6] [7] [8] or stimulate serotonin secretion [9] [10]. Such lectin property may be used not only to analyze the carbohydrate structures of platelets glycoproteins, but also to study how these molecules are involved in the process of activating the platelets [10]; *Canavalia ensiformis* lectin (Concanavalina A, ConA) showed to be able in react with platelets glycoproteins (GP) Ib and IIIa [10] as well as to isolate GP III [12] [13] while *Lens culinaris* lectin was able to purify GP IIb-IIIa [14].

The aim of this work was to evaluate Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 3 and Cramoll 4 activity regarding the processes of platelet agglutination. In addition, it was analyzed if there is any difference between agglutination in platelets from distinct types of human blood and rabbit blood. All of the activities from different isoforms lectins were compared with the effect of WGA and Con A.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Reagents

The reagents were acquired from Sigma (USA), WGA and Con A from Pharmacia Chemical (Swedish).

2.2 Isolation of Cramoll lectins

C. mollis lectin isoforms were purified following previously established protocols [3] [4]. *C. mollis* seed extract (10% w/v prepared in 0.15M NaCl) was fractionated using ammonium sulphate (40–60% w/v) and the fraction obtained was submitted to affinity chromatography in Sephadex G-75 for Cramoll 1 and Cramoll 4 ; gel filtration in Sephadex G-100 followed by ion exchange chromatography with CM-Cellulose for Cramoll 3. To purify Cramoll 2, SF 40-60% was chromatographed on a Sephadex G-75 column and the unadsorbed fractions were passed through a Bio-Gel P-200 column. Lectin concentrations were adjusted to 1 mg/ml.

2.3 Washed platelets

Human venous blood from healthy volunteers and adult rabbit venous blood was collected into plastic tubes containing 3.8% trisodium citrate. Platelet rich plasma (PRP) was obtained by centrifugation at $141 \times g$ for 12 min at room temperature. Washed platelets (WP) were obtained by centrifugation of PRP containing 2% EDTA (EDTA/PRP 1:20) at $880 \times g$ for 15 min followed by two washes with washing buffer (140 mM NaCl, 10 mM NaHCO₃, 2.5 mM KCl, 0.9 mM Na₂HPO₃, 2.1 mM MgCl₂, 22 mM C₆H₅Na₃O₇, 0.055 mM glucose, 0.053 mM BSA, pH 6.5). The pellet was suspended in 2mL Tyrode buffer (10 mM Hepes, 134 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 12 mM

NaHCO₃, 2.9 mM KCl, 0.34 mM Na₂HPO₄, 1 mM MgCl₂, 0.055 mM glucose, pH 7.4). The platelets were counted in a Sereno-Baker 9020+AX System and adjusted for a final concentration of 3×10^6 /mL with Tyrode buffer.

2.4 Platelet agglutination by lectins

Agglutination tests were done on microtitre plates, 50 µL of 0.15 M NaCl were placed in each well of the plate and then 50 µL of each lectin were added to the second well of each row. The serial dilution method was performed and 50 µL of washed platelets were added to each well; after 45 min, the absorbance at 450 nm was determined in plate reader.

2.5 Platelet agglutination in carbohydrate presence

Tests for of platelet agglutination in carbohydrate presence were similar to previous test, replacing the 0.15 M NaCl solutions by monosaccharide (0.2 M): D-glucose when using Cramoll 1, 2 and 4; D-galactose with Cramoll 3, methyl- α -D-manopiranoside with Con A and N-acetyl-D-glucosamine with WGA. Incubation of lectin with carbohydrate was performed 15 min at room temperature before adding the preparation containing platelets; after 45 min, the absorbance at 450 nm was determined in plate reader.

2.5 Statistical analysis

Data were plotted as mean values $\pm$ standard desviation (SD) and were analysed considering the value of $p < 0.05$ as statistically significant. Statistical significance was determined by Two-Away analysis of Variance with Bonferroni's post-test analysis. For statistical analysis was used GraphPad Prism 5® software.

3. RESULTS AND DISCUSSION

Platelets respond to certain lectins with aggregation and/or discharge of secretion organelles (reaction of secretion). There are some lectins that selectively induce agglutination and others which cause a strong secretion reaction without accompanied agglutination [13]. In this study, it was detected that binding of the lectin isoforms from *C. mollis*, Con A and WGA on washed human platelets and rabbit; the percentage of agglutination ranged from 15 to 83% (Table 1).

Many studies about agglutination of intact platelets or isolated platelet membrane don't discriminate the type of human blood [2] [10] [15]. Con A agglutinated human and rabbit washed platelets almost with same percentage, differing only in platelets of blood type O. Similar results with this lectin were obtained with intact human platelets [2] but when they were tested with only isolated platelet membranes presented a different profile [10]. The agglutination of the membranes may be a consequence of exposure of interaction sites during the isolation process. It has been shown that platelet membranes washed in buffer without EDTA, containing Triton X-100 showed a pattern different than unwashed platelets with EDTA in the same buffer containing EDTA [16].

WGA lectin display best results with blood types A and AB as well as rabbit platelets. The best agglutination percentage results were similar to Cramoll 1 and Cramoll 3 for blood type A, O platelets. Cramoll 2 and Cramoll 4 presented best result of agglutination to blood type A platelets. The agglutination of washed platelets by different lectins was probably due to the washing procedure, because studies have shown that human washed platelets contain glycoproteins exposed and the procedure for obtaining these cells did not destroy these interaction sites [11].

The different isoforms of Cramoll agglutinated with less intensity, platelets obtained from human blood type AB. Con A, lectin with similar structure to the Cramoll 1 [12] also showed less effect with blood type AB and type B platelets. Studies report that affinity of lectins to cells can be due to factors such as: existence of non specific interactions with cell-surface with components not glycidic; the presence in the lectin structure of a binding site with specificity to oligosaccharide and a cooperative effect resulting from the multivalent nature of these proteins [13]. The results obtained in

agglutination assays using platelets from different blood types, revealed that the isoforms Cramoll differ structurally and that between the isoforms, Cramoll 3 and Cramoll 4 are the most similar in promote agglutination human platelets, despite the different monosaccharide specificity of these lectins.

The platelet agglutination tests were done using solutions of monosaccharides that are inhibitors of hemagglutinating activity of lectins. In Figures 1 and 2, there is a comparison of the agglutination activity in the absence and presence of monosaccharide. It was not observed total inhibition of agglutination with the monosaccharide solution; however, the reduction in agglutination activity was detected for all tested lectins.

The inhibition of lectin results in different answers depending on the used platelets. Only the agglutination of blood platelets type A was reduced when WGA was incubated with monosaccharide inhibitor (Figure 1A); inhibition of Con A (Figure 1B) and Cramoll 2 (Figure 2B) affected the agglutination of blood platelets type O; inhibition of Cramoll 1 and Cramoll 3 decrease agglutination on rabbit platelets (Figure 2A and Figure 2C), however inhibition Cramoll 1, Cramoll 2 and Cramoll 4 reduce blood platelets type B agglutination (Figure 2A, 2B and 2D).

The GP of platelet membrane differ as to the content and composition of the carbohydrates. GP IIb consists of similar amounts of mannose, galactose, and N-acetylglucosamine; GP IIIa contains a percentage of carbohydrate (16%) similar to GP IIb (14%) but mannose is the main component [14]. Monosaccharide specificity of Con A, WGA and the isoforms of the lectin of *C. mollis* enable specifically interact with the GP through the carbohydrate binding site. [15] In any case was observed total agglutination inhibition with the monosaccharide solution, however the reduction in agglutinate activity was detected in all lectins evaluated.

Relating the results obtained with the carbohydrates specificity of lectins showed that the inhibition of lectins with similar sugar specificity (Cramoll 1, Cramoll 2, Cramoll 4 and Con A), resulted in reduced platelet agglutination of different blood types. This fact associated with the partial inhibition in some of the tests of agglutination, probably reflects the participation of other types of interaction between lectin and the platelet, beyond that specific, via the carbohydrate binding site [11].

Platelet agglutination tests as well as the inhibition of this process, using the isoforms of *C. mollis* has shown that the interaction between the lectins and platelets was distinct and contributed to identify the nature structurally different of the isoforms Cramoll 1, 2, 3 and 4.

REFERENCES

- [01] Sharon N, Lis, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology** 2004, 14 (11), 53R–62R.
- [02] Greenberg, JH, Jamieson, GA. The effects of various lectins on platelet aggregation and release. **Biochimica et Biophysica Acta** 1984, 345, 231-234.
- [03] Paiva, PMG, Coelho, LCB. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Applied Biochemical and Biotechnology** 1992, 36, 113-118.
- [04] Correia, MTS, Coelho, LCB. Purification of a glucose mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (Camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology** 1995, 55, 261-273.
- [05] Konozy, EHE, Bernardes, ES, Rosa, C, Faca, V, Greene, LJ, Ward, RJ. Isolation, purification, and physicochemical characterization of a D-galactose-binding lectin from seeds of *Erythrina speciosa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 2003, 410, 222-229.
- [06] Davies, GE, Palek, J. Platelet protein organization: Analysis by treatment with membrane-permeable cross-linking reagents. **Blood** 1982, 59, 502-513.
- [07] Silva, MCC. et al. Immobilized *Cratylia mollis* lectin: An affinity matrix to purify a soybean (*Glycine max*) seed protein with in vitro platelet antiaggregation and anticoagulant activities. **Process Biochemistry** 2011, 46, 1, 74-80.
- [08] Clemetson, K. J. Snaclecs (snake C-type lectins) that inhibit or activate platelets by binding to receptors. **Toxicon**, 2010, 56, 7, 1236-1246.
- [09] Samal, AB, Timoshenko, AV, Loiko, EN, Kaltner, J, Gabius, HJ. Formation of lactose- resistant aggregates of human platelets induced by the Mistletoe lectin and

differential signaling responses to cell contact formation by the lectin or thrombin. **Biochemistry** 1998, 63, 516-522.

[10] Smirnova, IV, Khaspekova, SG. Interaction of wheat germ agglutinin and concanavalin A with platelets. stimulation of platelet functional reactions and binding with membrane glycoproteins. **Biochemistry** 1998, 63, 710-718.

[11] Montecchio, M. Agregação plaquetária – interesse científico e informação. **NewsLab** 1999, 25, 70-75.

[12] Hagen, Brossmer, R, Worner, P. D-Galactose-binding lectins induce a differential response of blood platelets. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 1977, 75, 200-206.

[13] Hagen, I, Bjerrum, OJ, Gogstad, G, Korsmo, R, Solum, NO. Involvement of divalent cations in the complex between the platelet glycoproteins IIb and IIIa. **Biochimica et Biophysica Acta** 1982, 701, 1-6.

[14] Knibbs RN, Takagaki, M, Blake, DA, Goldstein, IJ. The role of valence on the high-affinity binding of *Griffonia simplicifolia* isolectins to type A human erythrocytes. **Biochemistry** 1998, 37, 16952-16957.

[15] Ganguly, P, Gould, NL, Sidhu, P. Interaction of lectins with human platelets? Effects on platelets stimulation by thrombin and ristocetin. **Biochimica et Biophysica Acta** 1979, 586, 574-586.

[16] McEver, RP; Baenziger, JU; Majerus, PW. Isolation and structural characterization of the polypeptide subunits of membrane glycoprotein IIb-IIIa from human platelets. **Blood** 1982, 59 (1), 80-85.

[17] Nachman RL, Leung, LLK. Complex formation of platelet membrane glycoproteins IIb and IIIa with fibrinogen. **Journal of Clinical Investigation** 1982, 263-269.

Table 1: Agglutination of washed platelets obtained from human blood and rabbit blood by commercial lectins and lectin isoforms of *C. mollis*

Lectin (1 mg/mL)	Specificity	Agglutination (%)				
		A	B	AB	O	R
Con A	Methyl-D-mannopyranoside	48±4.76	38±4.97	37±4.55	77.5±5.97	40.7±2.22
WGA	N-acetyl-D-glucosamine	52±2.45	15±3.91	43±2.83	34.7±1.7	64±3.16
Cramoll 1	D-glucose	63±2.16	60.2±2.5	43.7±1.5	42.5±2.38	73±1.63
Cramoll 2	D-glucose	81.2±1.7	64.2±0.96	55±1.63	73±2.16	62±1.63
Cramoll 3	D-galactose	62.5±2.08	51.7±1.7	32.5±2.08	43.7±1.5	59.2±1.7
Cramoll 4	D-glucose	83.5±2.64	54.7±0.96	35.2±0.96	45.7±1.7	71.25±3

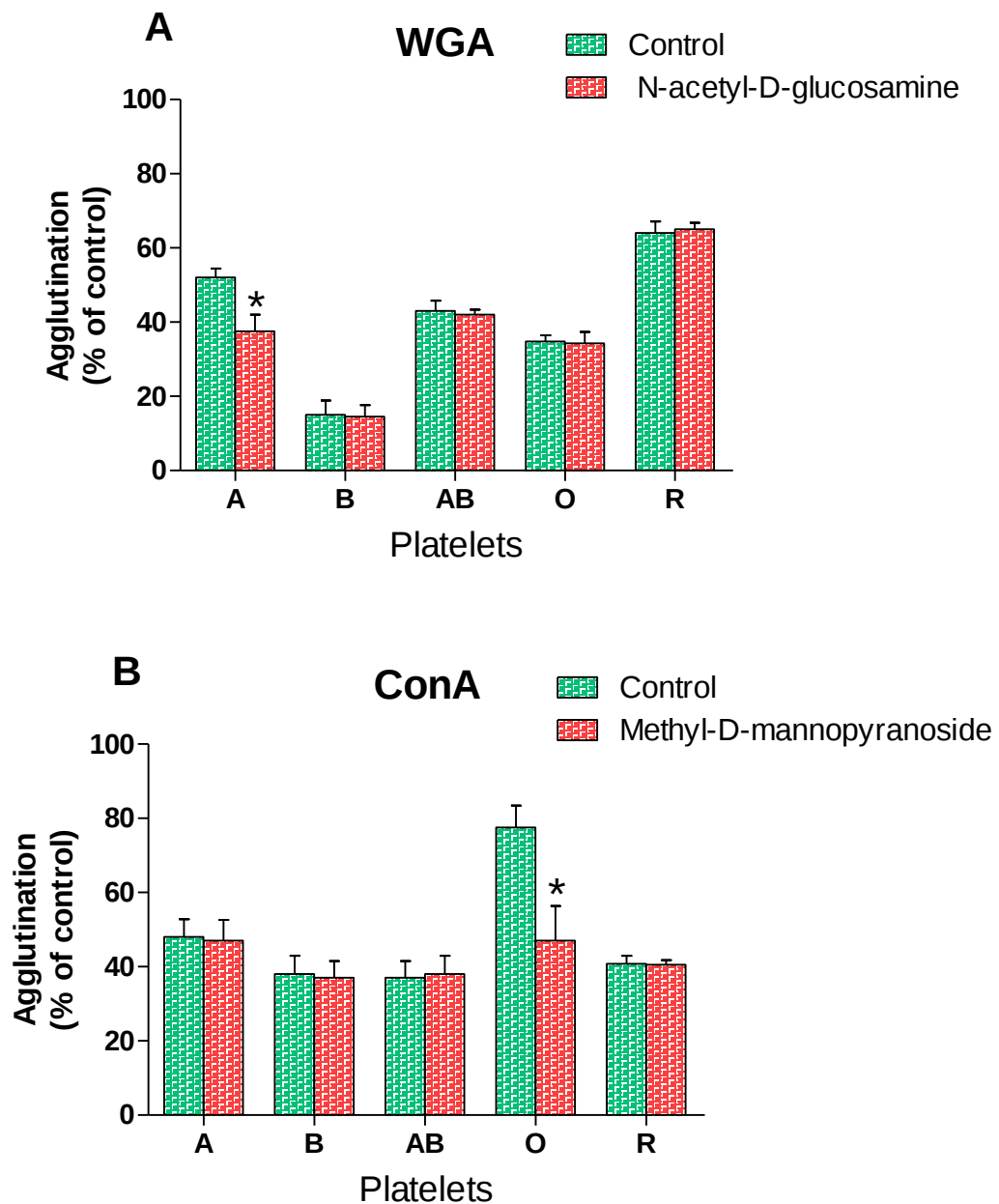


Figure 1: WGA e ConA promote platelet agglutination. Platelets from blood type A, AB, B, O and rabbit blood was washed and exposed to WGA (A) and ConA (B) lectins. The percentage of agglutination compared to the control was calculated. Specific monosaccharides were added to each well containing the lectin and inhibition of platelet agglutination was measured spectrophotometrically. The values represent the mean $\pm$ S.D. of at least three independent experiments. *Significantly different from the respective control at $P < 0.05$, Two-Way Analysis of Variance with Bonferroni's post-tests analysis.

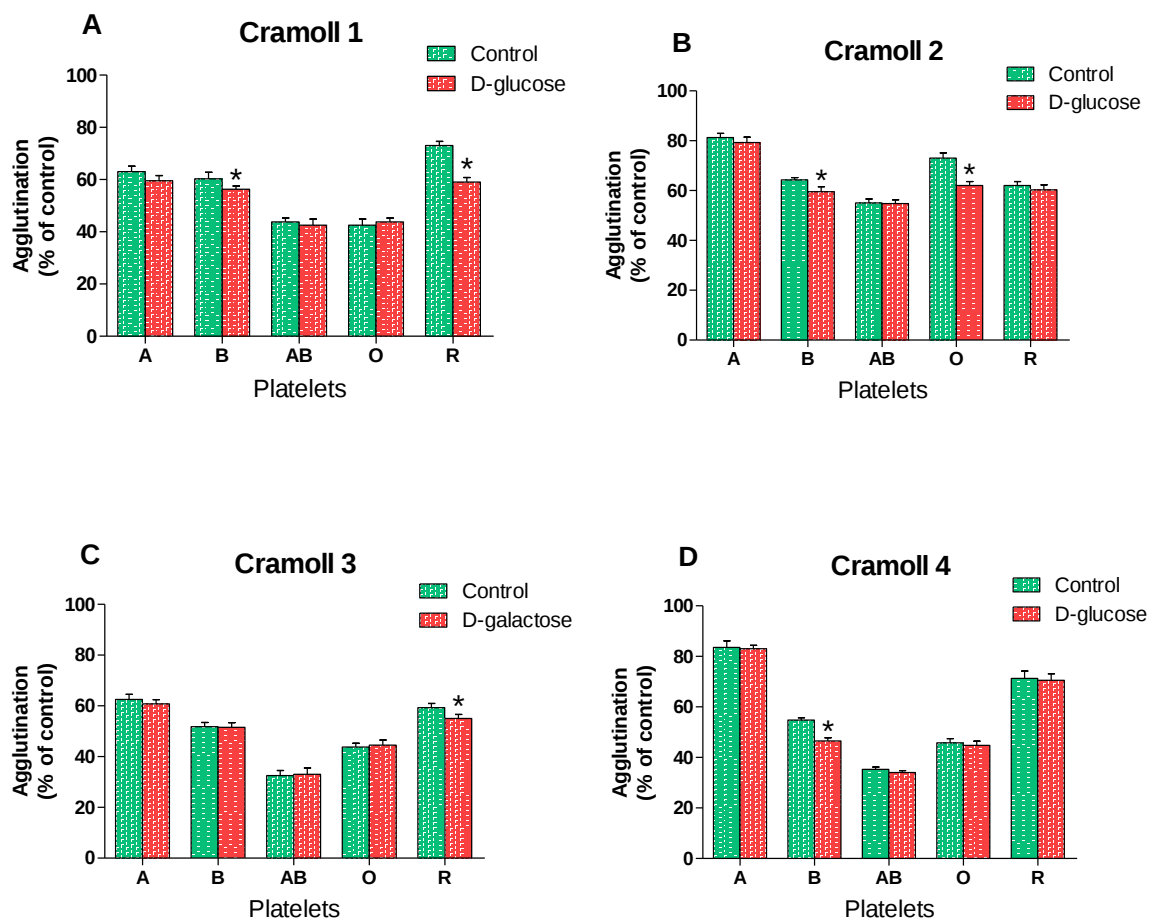


Figure 2: Cramoll Isoforms promote platelet agglutination. Platelets from blood type A, AB, B, O and rabbit blood was washed and exposed to Cramoll 1 (A) Cramoll 2 (B), Cramoll 3 (C) and Cramoll 4 (D). The percentage of agglutination compared to the control was calculated. Specific monosaccharides were added to each well containing the lectin and inhibition of platelet agglutination was measured spectrophotometrically. The values represent the mean $\pm$ S.D. *Significantly different from the respective control at $P < 0.05$, Two-Way Analysis of Variance with Bonferroni's post-tests analysis.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

Os protocolos experimentais utilizados no decorrer desta pesquisa, permitem concluir que:

- A viabilidade de células PC-3 diminuiu, progressivamente, com o aumento das concentrações das lectinas Cramoll 1,4 e rCramoll;
- Cramoll 1,4 e rCramoll apresentaram toxicidade maior para células PC-3 quando comparas à lectina ConA;
- A viabilidade de células PC-3 foi reduzida após 2 horas de tratamento com as lectinas Cramoll 1,4 e rCramoll;
- Todas as lectinas avaliadas induzem morte celular por necrose;
- Células PC-3 expostas às lectinas Cramoll 1,4 e rCramoll apresentaram um aumento de cerca de 3 vezes nos níveis de superóxido mitocondrial;
- Níveis de cálcio citosólico mostraram-se aumentados após o tratamento de células PC-3 com as lectinas Cramoll 1,4 e rCramoll;
- Inibidores da abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial não foram capazes de proteger células PC-3 da morte após exposição às lectinas Cramoll 1,4 e rCramoll;
- A morte de células PC-3 ocorreu, provavelmente, devido a uma diminuição na fosforilação oxidativa, culminando na deficiência de ATP e privação de energia;
- Isoformas de Cramoll aglutinaram plaquetas em graus variando entre 32.5 ± 2.08 % a 83.5 ± 2.64 % quando comparadas ao controle;
- A aglutinação plaquetária ocorreu em maior percentual nas plaquetas provenientes de sangue tipo A e em menor intensidade em plaquetas provenientes de sangue tipo AB;

- Apesar da especificidade a carboidratos diferente entre Cramoll 3 e Cramoll 4, estas isoformas apresentaram semelhança quanto à promoção de aglutinação de plaquetas humanas;
- Ensaios de inibição da aglutinação de plaquetas mostraram que, na maior parte das vezes, os carboidratos específicos não conseguiram inibir totalmente a aglutinação de plaquetas.