

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

JÉSSICA DE SANTANA BRITO

PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE
IMUNOMODULADORA DE LECTINA DE INFLORESCÊNCIA DE *Alpinia*
purpurata

RECIFE
2018

JÉSSICA DE SANTANA BRITO

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE
IMUNOMODULADORA DE LECTINA DE INFLORESCÊNCIA DE *Alpinia
purpurata***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Área de Concentração Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão

Coorientadora: Profa. Dra. Marília Cavalcanti Coriolano

RECIFE
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Brito, Jéssica de Santana

Purificação, caracterização e avaliação de atividade
imunomoduladora de lectina de inflorescência de *Alpinia purpurata*/
Jéssica de Santana Brito- 2018.

71 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Thiago Henrique Napoleão

Coorientadora: Marília Cavalcanti Coriolano

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em

Bioquímica e Fisiologia. Recife, 2018.

Inclui referências e apêndice

1. Lectinas 2. Citocinas 3. Linfócitos I. Napoleão, Thiago Henrique
(orient.) II. Coriolano, Marília Cavalcanti (coorient.) III. Título

572.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-231

JÉSSICA DE SANTANA BRITO

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE
IMUNOMODULADORA DE LECTINA DE INFLORESCÊNCIA DE *Alpinia
purpurata***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica e Fisiologia, Área de Concentração
Ciências Biológicas, da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do
título de mestre em Bioquímica e Fisiologia

Aprovada em 20/02/2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão/
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva/
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Emmanuel Viana Pontual/
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dra. Maiara Celine de Moura/
Universidade Federal de Pernambuco

RECIFE, 2018

Dedico esse trabalho e tudo que tenho em minha vida à minha família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelo cuidado, sabedoria e força que Ele tem dado a mim nessa caminhada, por me fazer amadurecer cada dia mais, atentando para coisas que dão sentido à minha vida.

À minha família, que é a base de tudo que tenho e sou. Eles são o meu lar, em quem encontro paz e calma. Meus exemplos, meu orgulho e inspiração. São as pessoas que me fazem querer ser melhor sempre.

Agradeço de coração ao meu orientador e professor Dr. Thiago Henrique Napoleão, que me acolheu, ensinou e me acompanhou durante o projeto, sempre presente e disposto a ajudar e responder questionamentos, me fazendo ser uma melhor aluna e pesquisadora. Agradeço também à minha coorientadora, a Prof^a. Dra. Marília Cavalcanti Coriolano, responsável por me inserir no mundo da pesquisa e que sempre esteve disposta a diálogos e me faz perceber de maneira simples o quanto ainda tenho a amadurecer nesse vasto mundo da ciência.

Um agradecimento especial à Prof^a. Dra. Cristiane Moutinho de Lagos Melo, a quem tive o prazer e honra de conhecer no ano que se passou. Foi uma satisfação imensa ter me aproximado de alguém com seu caráter e conhecimento. Fiquei fascinada com o que aprendi com você. Gostaria sempre de retribuir da mesma forma tudo que você me proporcionou e que essa parceria persista por longo tempo.

Agradeço a todos os componentes do Laboratório de Imunoparasitologia do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM/Fiocruz Pernambuco), que disponibilizaram seu tempo e materiais para nos ensinar, ajudar e fazer crescer no conhecimento. Meu agradecimento especial à Dra. Virgínia Maria de Barros Lorena, como também aos colegas Leyllane, Ana Karine, Michele e Mineo.

Agradeço em especial a Gustavo Ramos, meu parceiro de longa caminhada, sempre partilhando tudo que fazemos, e também a Bruno Barboza recém-chegado ao laboratório, mas que vem demonstrando bastante vontade e disposição a aprender. Eles dividiram comigo o árduo processo de purificação de uma nova molécula, aguentaram todos os imprevistos e se mostraram dispostos a sempre ajudar.

Agradeço também a Leydianne, uma pessoa maravilhosa que também tive o prazer de me aproximar e tornar amiga. Crescemos juntas nos ajudando em nossos projetos e tenho certeza que nossa caminhada será longa e cheia de sucesso.

Agradeço a todos do Laboratório de Bioquímica de Proteínas, pelos ensinamentos e companheirismo no dia a dia.

Por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro.

“Não temas, porque Eu sou contigo; não te assombres, porque Eu sou teu Deus; Eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a destra da minha justiça”.

Isaías 41:10

RESUMO

Alpinia purpurata é uma planta ornamental também conhecida como fonte de moléculas bioativas. Lectinas são proteínas capazes de se ligar a carboidratos e exercerem diversas atividades biológicas. O presente estudo descreve o isolamento de uma lectina extraída das inflorescências de *A. purpurata* (ApuL) e a avaliação de seu potencial imunomodulador. Proteínas foram extraídas da farinha das brácteas através de homogeneização (16 h, 4°C) em NaCl 0,15 M. Após filtração e centrifugação, o extrato obtido foi tratado com sulfato de amônio (40% de saturação) durante 4 h a 28°C. As frações de proteínas precipitadas (FP) e sobrenadante (FS) foram dialisadas e avaliadas quanto à concentração de proteínas e atividade hemaglutinante (AH). A fração com maior AH específica (FS) foi submetida à cromatografia de gel filtração em coluna de Sephadex G-75. Frações de 5 mL foram coletadas e avaliadas quanto a absorbância a 280 nm e AH. O primeiro pico obtido nessa cromatografia correspondeu à lectina, que foi caracterizada quanto à massa molecular nativa, composição em subunidades, especificidade de ligação a carboidratos e estabilidade da AH frente a variações de temperatura e pH. A ação imunomoduladora foi avaliada investigando a produção de citocinas e liberação de óxido nítrico por células mononucleares de sangue periférico humano incubadas ou não com a lectina (12,5 µg/mL). Além disso, a diferenciação e ativação de linfócitos foram avaliadas por ensaios de imunofenotipagem. ApuL é uma proteína acídica, com massa molecular nativa de 34 kDa, e oligomérica (formada por subunidades de 7,4 kDa). AH da lectina foi inibida pelas glicoproteínas fetuína e ovoalbumina; resistente ao aquecimento a 100 °C por 20 min; estimulada na presença de íons cálcio e magnésio; e maior em pH 7,5. ApuL induziu as células de sangue periférico a liberarem citocinas pertencentes aos perfis Th1 (IFN-γ, TNF-α e IL-6) e Th17 (IL-17A), bem como óxido nítrico, estimulando um ambiente pró-inflamatório. Além disso, ApuL estimulou a produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória com papel regulador. A incubação com a lectina promoveu diferenciação e ativação dos subconjuntos de linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺, como evidenciado pela maior expressão da molécula CD28. Em conclusão, a inflorescência de *A. purpurata* é fonte de uma lectina com ação imunomoduladora e potencial aplicação biomédica, o que adiciona valor biotecnológico a esta planta ornamental.

Palavras-chave: Lectinas. Citocinas. Perfil pró-inflamatório. Linfócitos.

ABSTRACT

Alpinia purpurata is an ornamental crop also known as source of bioactive molecules. Lectins are proteins capable of binding carbohydrates and that exert several biological properties. The present study describes the isolation of a lectin extracted from the bracts of inflorescences of *A. purpurata* (ApuL) and the evaluation of its immunomodulatory potential. Proteins were extracted from the bracts flour by homogenization (16 h, 4 °C) in 0.15 M NaCl. After filtration and centrifugation, the extract obtained was treated with ammonium sulfate (40% saturation) for 4 h at 28 °C. The precipitated (PF) and supernatant (SF) fractions were dialyzed and evaluated for protein concentration and hemagglutinating activity (HA). SF, which was the fraction with highest specific HA, was submitted to gel filtration chromatography on a Sephadex G-75 column. Fractions of 5 mL were collected and evaluated for absorbance at 280 nm and HA. The first peak obtained in this chromatography corresponded to the lectin, which was characterized for native molecular mass, subunit composition, carbohydrate-binding specificity, and stability of HA toward temperature and pH variation. The immunomodulatory action was evaluated by investigating cytokine production and release of nitric oxide by human peripheral blood mononuclear cells treated or not with the lectin (12.5 µg/mL). In addition, the differentiation and activation of lymphocytes were evaluated by immunophenotyping assays. ApuL is an acidic, 34-kDa native molecular mass, and oligomeric protein (formed by subunits of 7.4 kDa). HA of lectin was inhibited by the glycoproteins fetuin and ovalbumin; resistant to heating at 100 °C for 20 min; stimulated in the presence of calcium and magnesium ions; and highest at pH 7.5. ApuL induced peripheral blood cells to release cytokines belonging to the Th1 (IFN-γ, TNF-α, and IL-6) and Th17 (IL-17A) profiles, as well as nitric oxide, stimulating a pro-inflammatory environment. In addition, ApuL stimulated the production of IL-10, an anti-inflammatory cytokine with regulatory role. Incubation with the lectin promoted differentiation and activation of the CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocyte subsets, as evidenced by the greater expression of the CD28 molecule. In conclusion, the inflorescence of *A. purpurata* is source of a lectin with immunomodulatory action and potential biomedical application, which adds biotechnological value to this ornamental plant.

Keywords: Lectins. Cytokines. Pro-inflammatory profile. Lymphocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

FIGURA 1. Imunidade inata e adaptativa	19
FIGURA 2. Interação dos macrófagos com células da imunidade inata e adaptativa.	21
FIGURA 3. Fases da imunidade inata e adaptativa.....	24
FIGURA 4. Diferenciação de células T CD4 ⁺ naive em subpopulações com diferentes ações na imunidade	29
FIGURA 5. Representação da atividade hemaglutinante de lectinas	32
FIGURA 6. <i>Alpinia purpurata</i> . Variante de brácteas vermelhas	39

ARTIGO

FIGURE 1. Purification of lectin from <i>Alpinia purpurata</i> inflorescence (ApuL). (A) Chromatographic separation of inflorescence extract on Sephadex G-75 column using 0.15 M NaCl (flow rate: 20 mL/h) as the mobile phase. Fractions of 2.0 mL were collected and evaluated for absorbance at 280 nm wavelength (ABS 280 nm). The inset shows the PAGE for native acidic proteins of PI stained with silver nitrate. (B) Gel-filtration chromatography of ApuL (1.0 mg protein) on a HiPrep 16/60 Sephacryl S-100HR column coupled to the ÄKTAprime plus system. (C) Electrophoresis of ApuL and molecular mass markers under denaturing conditions (SDS-PAGE). The gel was stained with silver nitrate	67
--	----

FIGURE 2. Investigation of the cytotoxic effect of ApuL (6.25–50 mg/mL) on human lymphocytes by flow cytometry using the markers annexin V (AnnV) and propidium iodide (PI). AnnV–/PI ⁺ cells were considered necrotic and AnnV ⁺ /PI [–] cells were considered apoptotic. ApuL failed to show any significant induction of cell death when compared with control (cells in RPMI medium). Vertical bars represent the average of six independent experiments performed in triplicates	68
---	----

FIGURE 3. Immunomodulatory effects of ApuL (12.5 mg/mL) on human PBMCs. (A–E) ApuL promoted higher (as indicated by the p-values) release of TNF- α (A), IL-17	
--	--

(B), IL-6 (C), IL-10 (D), and IFN-g (E) in comparison with control (cells in RPMI medium) in the 24-h assay. Nitric oxide (F) production was stimulated by ApuL as compared to the control. Bars represent the average of independent experiments performed in triplicates for each of the six individuals (blood donors)..... 68

FIGURE 4. ApuL (12.5 mg/mL) stimulated the differentiation of T CD8+ (A) and T CD4+ (B) subsets as compared with the control, as indicated by the p-values. Control represents cells cultured only with RPMI medium. The bars represent the average of independent experiments performed in triplicates for each of the six individuals (blood donors)69

FIGURE 5. Dot plot of T-lymphocyte activation promoted by ApuL (12.5 mg/mL) upon incubation with human PBMC for 24 h. ApuL stimulated the activation (expression of CD28 costimulatory molecule) of both TCD4+ (p = 0.02) and TCD8+ (p = 0.01) subsets as compared with the control (cells in RPMI medium). Dot plots represent the average of six independent experiments performed in triplicates69

LISTA DE TABELAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

TABELA 1. Lectinas de plantas com atividade imunomoduladora.....	37
---	----

ARTIGO

TABLE 1. Purification of lectin (ApuL) from <i>Alpinia purpurata</i> inflorescence	66
---	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACA	- Aglutinina de <i>Allium cepa</i>
AH	- Atividade hemaglutinante
APC	- Célula apresentadora de antígeno (<i>Antigen presenting cell</i>)
ApuL	- Lectina de inflorescência de <i>Alpinia purpurata</i>
Artin M	- Lectina de sementes de <i>Artocarpus integrifolia</i>
BBL	- Lectina de <i>Bauhinia bauhinioides</i>
CasuL	- Lectina de <i>Calliandra surinamensis</i>
CD	- <i>Cluster of differentiation</i>
Con A	- Lectina de sementes de <i>Canavalia ensiformis</i>
Con Br	- Lectina de sementes de <i>Canavalia brasiliensis</i>
CSF	- Fator estimulante de colônia (<i>colony stimulating fator</i>)
CTLA-4	- <i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i>
DAMP	- Padrão molecular associado ao dano (<i>Damage-associated molecular pattern</i>)
DC	- Célula dendrítica (<i>Dendritic cell</i>)
IFN- γ	- Interferon-gama
Ig	- Imunoglobulina
IL	- Interleucina
ILCs	- Células linfóides inatas (<i>Innate lymphoide cells</i>)
MHC	- Complexo de histocompatibilidade maior (<i>Major hiscompatibility complex</i>)
MvFL	- Lectina de fronde de <i>Microgramma vacciniifolia</i>
NK	- <i>Natural killer</i>
NO	- Óxido nítrico (<i>Nitric oxide</i>)
ONOO	- Peroxinitrito
PAMP	- Padrão molecular associado a patógeno (<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>)
PBMC	- Células mononucleares do sangue periférico (<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>).
PTL	- Lectina de <i>Pinellia ternata</i>
ScLL	- Lectina de <i>Synadenium carinatum</i>

SDS	- <i>Sodium dodecyl sulphate</i>
TGF- β	- Fator de crescimento tumoral- beta
Th	- Linfócito T helper
TLR	- <i>Toll like receptor</i>
TNF- α	- Fator de necrose tumoral- alfa
Treg	- Linfócito T regulador
WSMoL	- Lectina solúvel em água de sementes de <i>Moringa oleifera</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1 SISTEMA IMUNE	18
2.1.1 Imunidade inata	20
2.1.2 Imunidade adaptativa	23
2.2 PERFIS DE RESPOSTA DE LINFÓCITOS Th	25
2.3 RELAÇÃO ENTRE OS PERFIS DE LINFÓCITOS Th E DOENÇAS	29
2.4 LECTINAS: DEFINIÇÃO E MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO.....	31
2.4.1 Lectinas de plantas	34
2.4.2 Lectinas com atividade imunomoduladora	36
2.5 <i>Alpinia purpurata</i>	38
3 OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVO GERAL	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4 CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS	42
APÊNDICE A - LECTIN FROM INFLORESCENCES OF ORNAMENTAL CROP ALPINIA PURPURATA ACTS ON IMMUNE CELLS TO PROMOTE TH1 AND TH17 RESPONSES, NITRIC OXIDE RELEASE, AND LYMPHOCYTE ACTIVATION	63

1 INTRODUÇÃO

Considerando o quadro atual das diversas doenças que afetam a espécie humana e os problemas relacionados com fármacos sintéticos atualmente utilizados – como resistência bacteriana aos antibióticos e penetração limitada de drogas anticancerígenas através do tecido tumoral (FAIR; TOR, 2014; AL-ABD et al., 2015) – moléculas bioativas de fontes naturais ou recombinantes têm sido pesquisadas, visando tanto o potencial diagnóstico quanto terapêutico (COELHO et al., 2017). Por outro lado, muitas terapias à base de produtos vegetais não foram submetidas a uma avaliação científica adequada, apesar de alguns componentes das plantas apresentarem potencial para causar efeitos tóxicos graves e importante interação com outros fármacos. Dessa forma, é necessária a pesquisa contínua para elucidar as potencialidades e segurança de plantas medicinais e seus compostos (NASRI, RAFIEIAN-KOPAEI, 2014; THOOPTIANRAT et al., 2017).

O sistema imune é formado por um conjunto de células e moléculas que possuem a finalidade de reconhecer e eliminar estruturas estranhas ao organismo, como também atuar na remoção de células mortas e eliminação de células malformadas ou com alterações que comprometem sua função (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). No caso de algumas doenças, a modulação do sistema imune pode auxiliar na prevenção e tratamento. A pesquisa por novas drogas com a capacidade imunomoduladora tem sido alvo de estudos há décadas, principalmente as de fontes naturais. Uma grande variedade de famílias botânicas inclui espécies das quais se pode obter moléculas com atividade imunomoduladora, sendo as famílias Euphorbiaceae, Fabaceae, Moraceae, Rubiaceae e Zingiberaceae as mais relatadas (MARQUES et al., 2015).

As lectinas são proteínas que possuem a capacidade de ligar-se de forma específica e reversível a carboidratos (KARNCHANATAT et al., 2012; MACEDO et al., 2015). Apresentam diversas atividades biológicas, inclusive ação imunomoduladora (BATISTA et al., 2017; BUTLE et al., 2016). A ligação de lectinas a glicoconjugados presentes na superfície das células imunológicas pode desencadear efeitos como proliferação celular e alterações na liberação de citocinas (LAUBLI et al., 2014, SARTIM et al., 2014).

A *Alpinia purpurata*, conhecida popularmente como gengibre vermelho, é uma planta da família Zingiberaceae de caráter ornamental, originária dos países asiáticos. Estudos sobre o potencial biotecnológico desta espécie têm relatado diferentes atividades biológicas, tais como inseticida, antibacteriana e antioxidante (LIRA et al., 2015; SANTOS et al., 2012; SUBRAMANIAN; SUJA, 2011; VILLAFLORES et al., 2010).

Dentro desse contexto, o presente trabalho descreve o isolamento de uma lectina (ApuL) extraída das brácteas das inflorescências da *A. purpurata*; a lectina purificada foi caracterizada e avaliada quanto ao seu potencial citotóxico e imunomodulador sobre células mononucleares de sangue periférico humano.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 SISTEMA IMUNE

A imunidade é o conjunto de mecanismos de defesa de um organismo. As células e moléculas responsáveis pela imunidade constituem o sistema imune, e a sua resposta coletiva e coordenada frente à entrada de microrganismos e de substâncias estranhas é denominada de resposta imune. A defesa contra agentes infecciosos é mediada pelas reações iniciais da imunidade inata e pelas respostas tardias da imunidade adaptativa (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; KUMAR; BOT; 2016).

A importância do sistema imune é evidenciada quando indivíduos com respostas imunes defeituosas apresentam doenças infecciosas graves em maior frequência. Já a estimulação do sistema imune através da vacinação tem proporcionado a erradicação de muitas doenças como, por exemplo, a poliomielite, e diminuído a incidência de outras como tétano e rubéola (D'ARGENIO; WILSON, 2010; PULEDRAN, 2014).

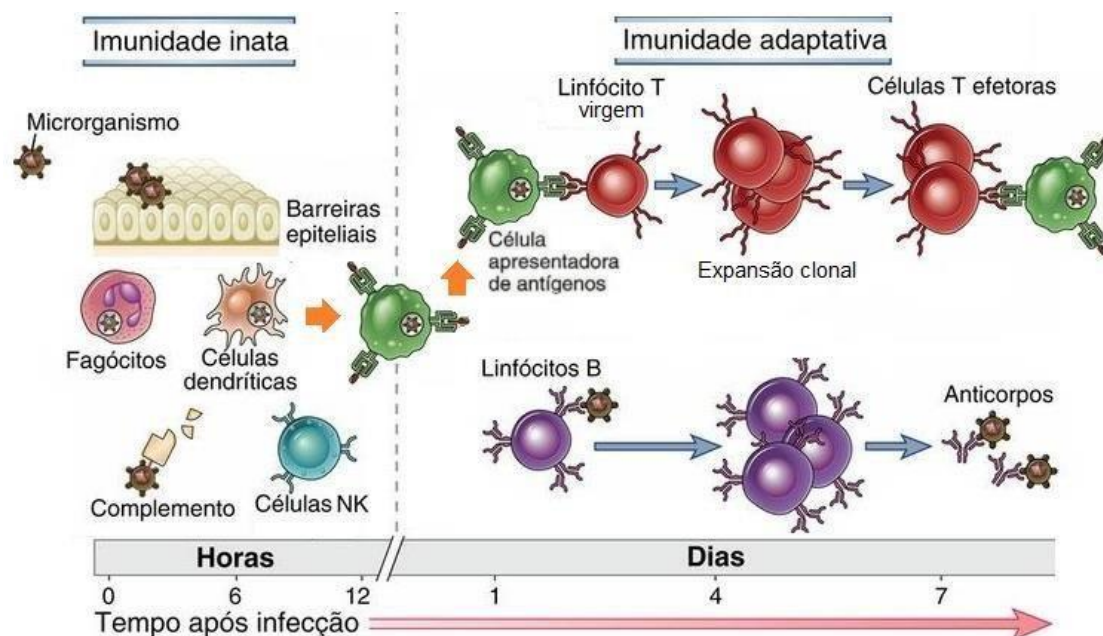
O funcionamento correto do sistema imune não se restringe apenas ao combate a processos infecciosos, mas também ao reconhecimento de células transformadas do próprio organismo, como células tumorais. Diversos métodos que promovem a estimulação do sistema imune para o tratamento antitumoral já são utilizados (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2014; TOPPER et al., 2017; OFFRINGA; GLENNIE, 2015).

A divisão da ação do sistema imune em imunidade inata e adaptativa (Figura 1) é utilizada principalmente para fins didáticos, uma vez que as células que as compõem estão em constante comunicação e são dependentes, umas das outras, para seu processo de ativação e regulação, cada uma atuando em processos iniciais e tardios contra determinado antígeno.

A comunicação das células imunes entre si, bem como com células não imunes, acontece por meio de proteínas secretadas, altamente indutíveis, chamadas de citocinas. Elas são agrupadas em várias famílias de proteínas que são referidas como fatores de necrose tumoral (TNFs), interleucinas (ILs) interferons (IFNs) e fatores estimulantes de colônias (CSFs) (ESQUIVEL-

VELÁZQUEZ et al., 2015). Essas moléculas orquestram uma variedade de processos, tais como regulação da inflamação local e sistêmica, proliferação celular, quimiotaxia e reparo tecidual (DUQUE; DESCOTEAUX, 2014).

FIGURA 1 - Imunidades inata e adaptativa.



Os mecanismos da imunidade inata correspondem à defesa inicial contra infecções. Após ultrapassar barreiras epiteliais, patógenos entram em contato com as primeiras células de defesa (fagócitos, células dendríticas e células Natural Killer, NK), as quais compõem a imunidade inata, juntamente com o sistema complemento. A imunidade adaptativa acontece com a ativação de linfócitos de maneira antígeno-específica, diferenciando-se em células produtoras de anticorpos (linfócitos B) e células efetoras (linfócitos T). As células dendríticas fazem a conexão entre a imunidade inata e adaptativa, a partir do momento em que se transformam em células apresentadoras de antígeno.

Fonte: Adaptado de Abbas et al. (2015)

A principal função das citocinas é regular a inflamação, e, como tal, desempenham um papel vital na regulação da resposta imunológica em processos fisiológicos e patológicos. As citocinas podem ser classificadas em pró e anti-inflamatórias (NEURATH et al., 2014, ROSSI et al., 2017) e são produzidas principalmente por macrófagos e linfócitos embora possam também ser produzidas por células polimorfonucleares, células endoteliais e epiteliais, adipócitos e células do tecido conjuntivo (DUQUE; DESCOTEAUX, 2014).

Cada citocina liga-se a um receptor de superfície celular específico para gerar uma cascata de sinalização que afeta a função celular. Isso inclui a

regulação positiva ou negativa de genes e fatores de transcrição, o que pode resultar na produção de outras citocinas, em um aumento no número de receptores de superfície para outras moléculas, ou eventualmente na supressão da expressão da própria da citocina (HAYDEN; GHOSH, 2014; IVASHKIV; DONLIN, 2014). Uma característica primária das citocinas é a de redundância funcional, quando diferentes citocinas compartilham funções semelhantes. Além disso, as citocinas são pleiotrópicas, pois atuam em diferentes tipos de células – as quais podem expressar diferentes receptores para uma mesma citocina (STENKEN; POSCHENRIEDER, 2015).

2.1.1 Imunidade inata

O sistema imune inato representa a primeira linha de defesa do organismo contra agentes patogênicos e um determinante importante para o direcionamento da resposta imune adaptativa (BOTTAZZI et al., 2010; MANTOVAI et al., 2011). A imunidade inata é composta principalmente por fagócitos, como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, células *Natural Killers* (NK), citocinas e sistema complemento. Macrófagos e neutrófilos fornecem a primeira defesa contra micro-organismos, enquanto que as células dendríticas fornecem uma importante conexão para o sistema imune adaptativo, por atuarem como células apresentadoras de antígeno (APCs, do inglês *antigen-presenting cells*).

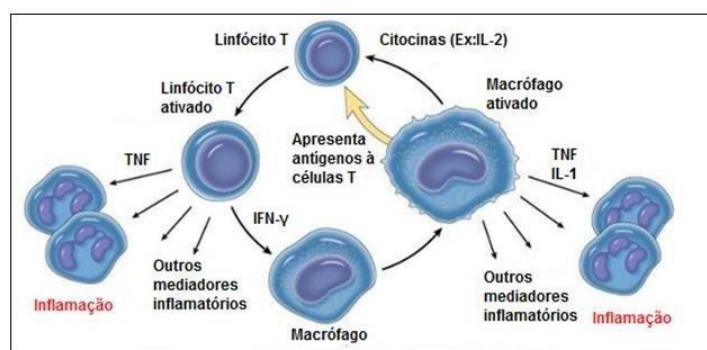
Os mecanismos da resposta inata são ativados a partir do reconhecimento de estruturas presentes nas superfícies dos micro-organismos, os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*) ou estruturas que são expressas em células que sofreram algum tipo de agressão, os padrões moleculares associados ao dano (DAMPs, do inglês *damage-associated molecular patterns*) (ABBAS, 2015; CRUVINEL, 2010). A imunidade inata representa uma rápida e padronizada resposta a um número grande de estímulos. A capacidade de reconhecer PAMPs é uma característica fundamental da imunidade inata, porém esta não tem a capacidade de lembrar-se de uma invasão anterior pelo mesmo patógeno, não podendo responder de forma mais rápida e eficiente contra o

mesmo insulto, principal característica que a difere da imunidade adaptativa (VAZQUEZ et al., 2015).

As células NK representam um subgrupo de glóbulos brancos que exercem respostas imunitárias precoces contra vírus e estão envolvidas em respostas imunes contra células cancerosas. Elas exercem citotoxicidade direta nas células-alvo e são potentes produtores da citocina interferon gama (IFN- γ). Possuem função citotóxica semelhante a células da imunidade adaptativa, porém agindo em um estágio inicial da imunidade inata (SPITS et al., 2013, FERLAZZO; MORANDI, 2014; GARDINER; MILLS, 2016).

Os macrófagos são células importantes na imunidade inata no que se refere à identificação de antígenos, atuando também na regulação do processo inflamatório e induzindo a deposição de matriz extracelular para reparo tecidual. Os macrófagos ativados, conhecidos como M1, são estimulados por PAMPs e/ou DAMPs, têm fenótipo pró-inflamatório e causam dano tecidual nas fases iniciais participando ativamente da resposta imune inata e adaptativa, como mostra a Figura 2. Eles colaboram com linfócitos T e B através de interações célula-célula utilizando o complexo de histocompatibilidade principal II (MHC II, do inglês *major histocompatibility complex II*) e mecanismos mediados em fase fluída, principalmente baseados na liberação de citocinas e quimiocinas (DALMAS ET AL., 2017; DUQUE; DESCOTEAUX, 2014).

FIGURA 2 - Interação dos macrófagos com células da imunidade inata e adaptativa.



Macrófagos são fagócitos que atuam na imunidade adaptativa através da secreção de mediadores inflamatórios e recrutamento de outras células para o sítio inflamatório. Ativam a imunidade adaptativa seja por estímulo através de citocinas ou ativação antígeno-específica, através da apresentação de antígenos aos linfócitos.

Fonte: Adaptado de Kummar et al. (2007).

Os macrófagos alternativos ativados, conhecidos como M2, são induzidos por diferentes estímulos (por exemplo, IL-4 e/ou IL-13, IL-10, TGF- β) e predominam na resposta inflamatória tardia. Eles sustentam a finalização da inflamação e promovem a angiogênese, a fibroplasia, a deposição de nova matriz extracelular e a remodelação final do tecido, através da produção de fatores de crescimento e proteases (MANTOVANI et al., 2013; DONI et al., 2017). M2 também atuam secretando citocinas, tais como IL-10, que atuam na regulação da resposta imune, prevenindo assim o dano ao tecido ou ao órgão (FRIDMAN et al., 2012; GAO et al., 2015). A atividade dos macrófagos pode ser aumentada por citocinas secretadas por células T auxiliares, por exemplo IFN- γ , que é um dos mais potentes ativadores de macrófagos (DUQUE; DESCOTEAUX, 2014).

O óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*), predominantemente produzido por macrófagos ativados, desempenha múltiplos papéis biológicos, por exemplo, em processos como sinalização celular, regulação da pressão sanguínea, coagulação, morte de células tumorais, entre outros (LOK et al., 2012; RAHMANTO et al., 2012; LOK et al., 2014). Um dos efeitos bastante estudados é a capacidade de M1, produtores de NO, atacarem células tumorais autopreservando-se. Por outro lado, a população de M2, que é conhecida por produzir pequenas quantidades de NO após a ativação, estimula o crescimento tumoral (WIEGERT; BRUNE, 2008; RIDNOUR et al., 2006; KOVACEVIC et al., 2017; BASUDHAR et al., 2016). Outra função principal do NO em processos infecciosos é a morte microbiana, através da geração de peroxinitrito, ONOO- (LO FARO et al., 2014).

O sistema complemento é composto por proteínas solúveis no plasma, presentes em todos os indivíduos, independentemente de contato prévio com imunógenos ou agentes agressores (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000; SHARMA; ALISSON, 2015). Esse sistema pode ser ativado por vias distintas conhecidas como via clássica, via da lectina ligadora de manose e via alternativa, todas agindo em cascata e possuindo uma via comum final. As proteínas do complemento agem com o objetivo de opsonizar patógenos e induzir respostas inflamatórias, ajudando no combate a infecções e manutenção da homeostase. Ainda, o sistema complemento promove a morte de patógenos através da formação do complexo de ataque à membrana.

Durante uma reinfecção o complemento também pode auxiliar na ativação da resposta imune adaptativa (KAPLAN, 2010; KOLEV et al. 2013; MERLE et al., 2015).

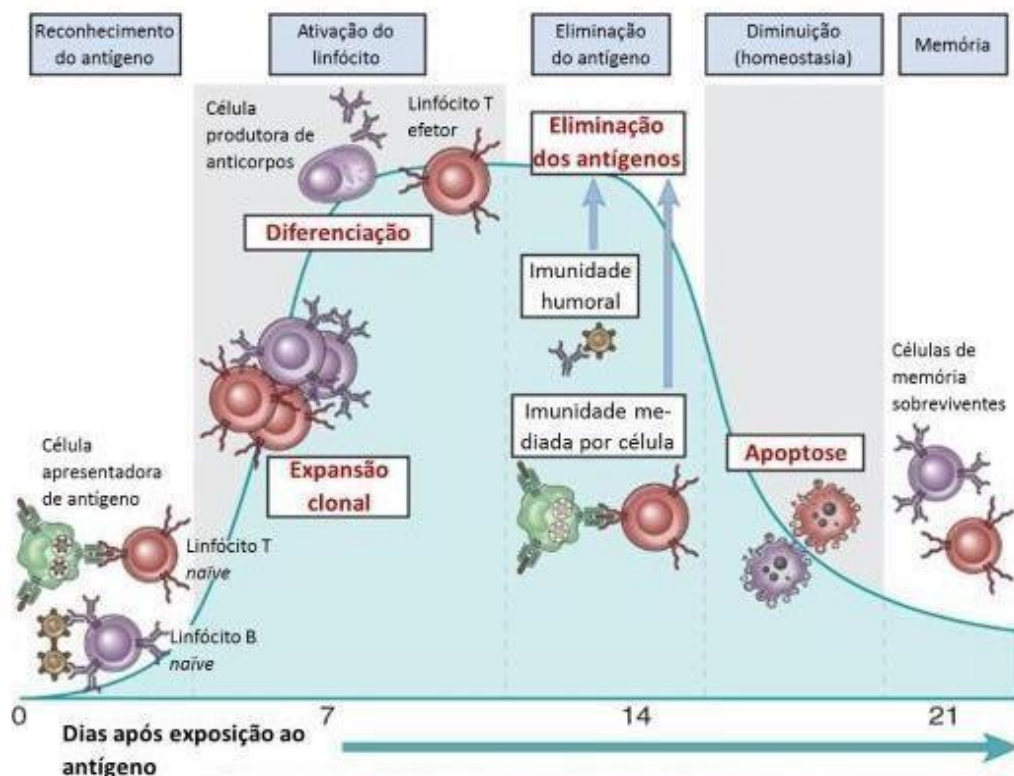
2.1.2 Imunidade adaptativa

Na imunidade adaptativa, os antígenos (substâncias estranhas que induzem as respostas imunes específicas) são reconhecidos por receptores de membrana das células do sistema, linfócitos B e T, que expressam um grande repertório de receptores celulares que são produzidos por recombinação somática específica. Funcionalmente, células T e B naïve (virgens) encontram antígenos em órgãos linfóides especializados e passam por um processo de proliferação celular e maturação antes de exercerem suas funções efetoras (VIVIER et al., 2011; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). O processo de ativação de uma resposta adaptativa a um antígeno ainda não conhecido é desencadeado pelas células dendríticas que se diferenciam em células apresentadoras de antígeno (Figura 3).

Quando antígenos são reconhecidos por receptores presentes nas membranas de linfócitos B, estas células diferenciam-se em plasmócitos produtores de anticorpos. Já os linfócitos T, quando reconhecem antígenos através dos seus receptores de membrana, exercem diferentes funções dentro da resposta imune. Os linfócitos T são subdivididos em dois tipos celulares: citotóxicos e auxiliares (Th, do inglês *T helpers*). Os citotóxicos (também chamados CD8+) têm a capacidade de destruição de células infectadas por vírus e bactérias intracelulares. Os linfócitos Th (também chamados de CD4+) são células responsáveis por secretar citocinas que atuam no recrutamento de células do sistema imune e na sua ativação (PAHAM, 2015; ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2015; COSMI et al., 2013).

As principais características da resposta adaptativa são a especificidade e memória imunológica. A especificidade é a capacidade das células de distinguirem entre diferentes substâncias. A memória imunológica diz respeito à habilidade das células responderem a uma exposição repetida ao mesmo antígeno de forma rápida e vigorosa (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2015).

FIGURA 3 – Fases da imunidade adaptativa.



A ativação de linfócitos se dá pelo contato inicial de um linfócito naíve com o antígeno por intermédio das células apresentadoras de antígeno. O linfócito T naíve, ao ser ativado, se diferencia em células efectoras produtoras de citocinas e citotóxicas, respectivamente. Linfócitos B naíve se diferenciarão em células produtoras de anticorpos. Esses dois tipos celulares, linfócitos T e B, atuarão conjuntamente para eliminação de antígenos. Após esse processo, parte das células será eliminada e outra parte permanecerá como células de memória.

Fonte: adaptado de Abbas et al. (2015).

As células T CD8⁺ são conhecidas principalmente por serem células efectoras contra patógenos intracelulares. Para iniciar suas funções, o linfócito T CD8⁺ naíve deve inicialmente ser ativado por membros especializados do sistema imunológico inato. Células T atuam localmente ao entrar em contato com células hospedeiras infectadas tanto por detecção de PAMPs apresentados pelo MHC de classe I ou interagirem diretamente com moléculas efectoras tóxicas. Após a depuração da infecção, os linfócitos T de memória permanecem (RUSSELL et al., 2002; SKON et al., 2013).

Os linfócitos T CD8⁺ usam várias formas para matar células infectadas e alteradas, tais como a secreção de citocinas como IFN- γ e TNF- α , que possuem efeitos antivirais, e liberação de grânulos citotóxicos contendo perforina e granzimas. No entanto, os linfócitos T CD8⁺ também podem

secretar um painel amplo de citocinas semelhantes aos subconjuntos de células T CD4+ bem descritos (PFEFFER et al., 2017).

A capacidade dos linfócitos Th de responder a infecções através da secreção de citocinas é um assunto bastante estudado na Imunologia. As células Th podem ser divididas em quatro principais subconjuntos distintos com base no perfil de secreção de citocinas apresentados pelas células: células Th1 que produzem IL-2, IFN- γ , TNF- α e linfotóxina-a; células Th2 caracterizadas pela produção de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13; células Th17 que produzem IL-17; e células T reguladoras (Treg) que produzem IL-10, IL-35 e TGF- β (RAMANI et al., 2015; BERNINK et al., 2013). Recentemente, foi descoberto outro perfil de células Th, o perfil Th9 que se caracteriza pela produção de IL-9 (SCHIMITT; KLEIN; BOPP, 2014; DENG et al., 2016).

A resposta dos linfócitos Th a um antígeno é dirigida pela resposta imune inata, de forma que o sub-tipo no qual o linfócito Th irá se diferenciar depende do ambiente no qual a APC encontrou inicialmente o antígeno, pois diferentes células da imunidade inata podem funcionar como uma fonte precoce de citocinas durante a resposta imune. A apresentação do antígeno processado pelo MHC de classe II, juntamente com moléculas co-estimuladoras e combinações precisas de citocinas, impulsiona a diferenciação de linfócitos Th naíves em células efetoras de perfil específico sendo Th1, Th2 ou Th17 (MIRCHANDANI et al., 2014; CIRACI et al., 2016; JANKOVIC; FENG, 2015).

A capacidade das células T virgens diferenciarem-se em linhagens Th distintas e os diferentes papéis dos subconjuntos Th com suas respectivas citocinas em infecções, alergias e auto-imunidade tem sido objeto de várias décadas de pesquisa (BERNINK et al., 2013; WILHELM et al., 2012; WALKER et al., 2013; SPITS; DI SANTO, 2011).

2.2 PERFIS DE RESPOSTA DE LINFÓCITOS Th

As respostas efetoras do tipo 1 são definidas por células Th1 e Th17, células T citotóxicas, grupos 1 e 3 de células linfóides inatas (ILCs) imunoglobulinas IgM, IgA e classes de anticorpos IgG específicos. Essa resposta efetora fornece imunidade contra bactérias, vírus, fungos e

protozoários. Elementos de imunidade tipo 1 também ajudam a manter vigilância imune anti-tumoral (WYNN, 2017). O fator chave necessário para a diferenciação de células Th1 a partir de linfócitos Th naíve é a IL-12, mas também a presença de IFN- γ desempenha um papel importante (COSMI et al., 2013). IFN- γ produzido por células Th1 já demonstrou um importante papel na ativação de macrófagos para combate a bactérias intracelulares (SALLUSTO et al., 2017).

A resposta imune do tipo 2 é caracterizada por células Th2, eosinófilos, mastócitos, basófilos, ILC2s, macrófagos induzidos por IL-4 e/ou IL-13, IgE e as citocinas IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 (WYNN, 2017; MIRCHANDANI et al., 2014). Quando a dicotomia Th1-Th2 foi descrita pela primeira vez por Mosmann & Cofman (1989), a imunidade do tipo 2 não foi considerada como uma resposta efetora importante, mas como um mecanismo regulatório, cuja principal função era limitar as consequências prejudiciais da imunidade protetora mediada por células Th1 (ABBAS, MURPHY, SHER, 1996). A compreensão do papel da imunidade tipo 2 se expandiu nos últimos anos. Além de suprimir a imunidade do tipo 1 e a inflamação conduzida por células Th1, a imunidade do tipo 2 surgiu como uma resposta efetora importante que possui ação de proteção ao hospedeiro contra infecções (WYNN, 2017; REDPATH et al., 2018).

Uma resposta Th2 oferece proteção contra parasitas extracelulares, aumentando as defesas iniciais em barreiras físicas, e também auxilia na manutenção da homeostase metabólica e promoção da remodelação tecidual após lesão (HEREDIA et al., 2013; CHAWLA; POLLARD, 2013;). Além disso, a imunidade do tipo 2 foi identificada como um mecanismo de proteção importante em várias doenças auto-imunes (ANTHONY et al., 2011) incluindo artrite, esclerose múltipla e doença de Crohn devido à sua capacidade de suprimir a inflamação de tipo 1 (CHEN et al., 2016; FINLAY et al., 2016).

O perfil Th17 exibe seis membros na família de citocinas de IL-17, incluindo IL-17A (comumente referida como IL-17), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (também conhecida como IL-25) e IL-17F (WANG et al., 2012). Há também a secreção de TNF- α (GAFFEN et al., 2014) e IFN- γ (LEXBERG et al., 2010). A diferenciação de células produtoras de IL-17 requer um conjunto de fatores de transcrição que não se sobrepõe aos fatores necessários para as células Th1 ou Th2 (DONG, 2011).

Os requisitos para a diferenciação Th17 são mais complexos do que para as células Th1 e Th2, pois a produção de IL-17 pode ser induzida por diferentes combinações de citocinas. Inicialmente, a combinação TGF- β e IL-6 foi identificada em camundongos (VELDHOEN et al., 2006), e em seguida foi proposta a combinação IL-1 β , IL-6 e/ou IL-23 em seres humanos (ACOSTA-RODRIGUEZ et al., 2007; COSMI et al., 2008). Na presença de um coquetel com as citocinas TGF- β , IL-1 β , IL-6 e IL-23, a diferenciação de Th17 foi eficiente em seres humanos (MANEL et al., 2008; KORN et al., 2009).

Células Th17 impulsionam o recrutamento de neutrófilos e a produção de peptídeos antimicrobianos em resposta a bactérias extracelulares e fungos (MISIAK et al., 2017). Um defeito na produção de IL-17 resulta em aumento da disseminação bacteriana, correlacionando-se com mediadores inflamatórios reduzidos e recrutamento de neutrófilos deficiente. IL-17 e IL-17F medeiam a função imunológica induzindo citocinas pró-inflamatórias, peptídeos anti-patogênicos e secreção de quimiocinas por células imunes efetoras (ISHIGAME et al., 2009; YANG et al., 2008). A liberação dessas moléculas pró-inflamatórias desencadeia recrutamento de células imunes inatas para o local de infecção e eliminação de patógenos. A IL-17 derivada de fontes inatas e adaptativas pode lutar contra a invasão de patógenos em diferentes fases e locais de infecção, o que adiciona maior complexidade a sua resposta imune (JIN; DONG, 2013).

Existe também outra subpopulação de células T CD4⁺, descrita mais recentemente quando comparada as demais, que é a subpopulação Th9. Esse subconjunto é caracterizado principalmente pela produção da IL-9, que possui efeito em vários tipos celulares incluindo mastócitos, eosinófilos, linfócitos T e células epiteliais (NOELLE; NOWAK, 2010; WILHELM et al., 2012). As células Th2 foram inicialmente descritas como a principal fonte de IL-9. Contudo, foi demonstrado que IL-9 e IL-4 raramente são produzidas pela mesma célula, indicando que as células Th9 representam um subconjunto de células Th distinto (STAUDT et al., 2010; VELDHOEN et al., 2008). Este subconjunto de células T CD4⁺ é desenvolvido sob a influência de IL-4 e TGF- β , e resulta na produção exclusiva de IL-9 ou em conjunto com IL-10 (KAPLAN, 2013; KAPLAN et al., 2015). No entanto, poucos dados estão disponíveis sobre o padrão de expressão das células Th9 em humanos (ANURADHA et al., 2016).

As células Th9, nos seres humanos, podem desempenhar um papel protetor (antitumoral), bem como um papel patogênico (alergia, asma e auto-imunidade) (PURWAR et al., 2012; SOROOSH; DOHERTY, 2009; PAN et al., 2013).

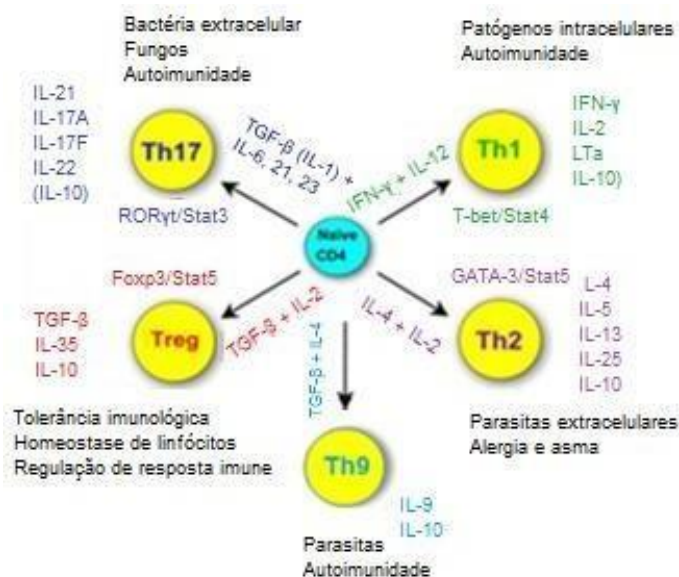
As células T reguladoras (Treg) têm a capacidade de regular as respostas imunes inatas e adaptativas. Elas expressam CD25 em sua superfície, o fator de transcrição FOXP3 e também expressam no citoplasma e superfície o receptor co-inibitório CTLA4 (YAMAGUCHI et al., 2011; KLOCKE; HOLMDAHL; WING, 2017). CTLA4 está envolvido na função supressora das células Treg pela diminuição da expressão de CD80 e CD86 (moléculas co-estimulatórias) nas células apresentadoras de antígeno (SAKAGUCHI et al., 2013). O desenvolvimento e sobrevivência de células Treg são muito dependentes de um número de fatores-chave e sinalização, incluindo IL-2, TGF- β e moléculas co-estimuladoras (como CD28) (KORN et al., 2009; HE et al., 2017).

As células Treg proliferam vigorosamente em ambientes inflamatórios (como em tumores e nas ilhotas pancreáticas de camundongos diabéticos não-obesos) muitas vezes em maior extensão do que outros subconjuntos de células T (SAKAGUCHI et al., 2013). Células Treg são responsáveis por manter as respostas imunes em equilíbrio e prevenir a reatividade imune excessiva e perigosa. Várias doenças humanas, incluindo câncer, infecções crônicas e síndromes autoimunes foram associadas ao desequilíbrio da ação das células Treg, o que parece contribuir para o processo da doença e ter um impacto na sobrevida do paciente (MOUGIAKAKOS et al., 2010; JENABIAN et al., 2010).

A Figura 4 traz as principais características e funções dos diferentes subtipos de células Th. É notório que a produção de IL-10 é compartilhada por diferentes subtipos celulares, dentre as quais estão células da imunidade inata, como macrófagos, monócitos, células dendríticas, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos e células NK, e células da imunidade adaptativa como células T CD4+, células T CD8+ e células B (SARAIVA; O'GARRA, 2010). A IL-10 foi primeiramente descrita sendo produzida por células Th2, inibindo a síntese de citocinas por macrófagos quando induzidos por células Th1, mas também é produzida e exerce efeitos em várias outras células. A IL-10 é uma citocina antiinflamatória com papel crucial na prevenção de patologias inflamatórias e

auto-imunes, regulando a resposta imune aos patógenos (CASTILLO, KOLLS, 2016). No entanto, a produção de IL-10 também pode restringir de forma inadequada as respostas imunes protetoras e, nesse contexto, a IL-10 pode contribuir para a infecção crônica (MOORE et al., 2001).

FIGURA 4 - Diferenciação de células T CD4+ naive em subpopulações com diferentes ações na imunidade.



Representação dos estímulos necessários no ambiente celular para o estabelecimento de cada subpopulação de linfócitos Th (CD4+). Após a diferenciação, cada perfil celular inicia sua própria produção de citocinas e atua através de diferentes mecanismos.

Fonte: adaptado de Zhu e Paul (2008).

2.3 RELAÇÃO ENTRE OS PERFIS DE LINFÓCITOS Th E DOENÇAS

Na atualidade, há diversas doenças relacionadas ao desequilíbrio do sistema imunológico, sejam doenças causadas por imunodeficiência ou por super ativação da resposta imune. Já foram relatadas as funções de determinados perfis celulares na geração e combate a doenças.

A desregulação da tolerância imune pode levar ao desenvolvimento de várias doenças dentre elas as alergias, asma, tumores, infecções crônicas, rejeição de órgãos transplantados e doenças auto-imunes. Como exemplo, a resposta tipo 2, quando desregulada, crônica ou hiper-reativa, pode contribuir para o desenvolvimento de doenças como alergias a drogas, toxinas e alimentos, asma, dermatite atópica, rinite alérgica, esofagite eosinofílica e

anafilaxia (PALM et al., 2012; AKDIS, 2012). Após a descoberta das células Th1 e Th2 por Mosmann et al. (1986), pesquisas apresentaram que uma resposta Th2 estaria relacionada ao desenvolvimento de doenças alérgicas e que as respostas Th1 seriam predominantes em infecções e auto-imunidade. Dessa forma, tem sido sugerido que uma mudança para uma resposta Th1 pode ser necessária para o tratamento bem-sucedido de alergias, e uma mudança para uma resposta Th2 pode ser benéfica para o tratamento de auto-imunidade (LICONA-LIMÓN et al., 2013; RAPHAEL et al., 2015; NOURI et al., 2015).

À medida que as respostas imunológicas do tipo 1 e do tipo 2 se encontram, as respostas de citocinas do tipo 2 suprimem o desenvolvimento da imunidade protetora do tipo 1 contra uma ampla gama de agentes patogênicos virais, bacterianos e protozoários, e assim pode facilitar a infecção descontrolada ou persistente (POTIAN et al., 2011; OSBORNE et al., 2014).

A supressão da imunidade do tipo 1 e do desenvolvimento de células T citotóxicas por imunidade do tipo 2 também pode estar envolvida com a promoção da tumorigênese e crescimento de células tumorais (OCHI et al.; 2012; TIAN et al., 2016). Estudos têm apontado o papel das subpopulações Th1 e Th17 na fisiopatologia de doenças auto-imunes. Tem sido sugerido que as citocinas relacionadas a células Th17, tais como IFN- γ , IL-17, IL-21 e IL-22, desempenham um papel na diabetogênese em ratos e em humanos. Embora o papel da IL-17 pareça ser de defesa em mucosas e direcionamento de resposta imune a patógenos extracelulares, ela também desempenha um papel crítico no processo inflamatório e no desenvolvimento de algumas doenças auto-imunes como artrite reumatóide, psoríase, esclerose múltipla e doença inflamatória intestinal. Por muito tempo, acreditava-se que essas doenças eram iniciadas por resposta Th1, porém estudos evidenciaram o papel de células Th17 na patogênese (PECK & MELLINS, 2009; CROME et al., 2010; LANGRISH et al., 2005, HIROTA et al., 2011).

Snell et al. (2016) comprovaram que a deficiência de células Th1 leva a um declínio progressivo de linfócitos T CD8⁺ e a um quadro persistente de infecção viral, enquanto seu reestabelecimento restaura o funcionamento normal e o número de linfócitos T CD8⁺ que são capazes de controlar a infecção viral. Com relação ao tratamento de câncer, algumas estratégias têm

sido usadas para direcionar respostas de linfócitos T a células tumorais, pois essas células apresentam vantagens como especificidade, memória e adaptação aos mais diversos tipos de antígenos expressos por tumores (SHARMA; ALLISON, 2014). Nos humanos, tem sido demonstrado que os linfócitos participam de diversas respostas antitumorais. As células T, ao infiltrarem tumores, estão associadas a resultado clínico de melhor prognóstico para câncer de mama e de pulmão (LOI et al., 2014; DJENIDI et al., 2015). Tosolini et al. (2011) mostraram que pacientes que possuíam tumores colorretais infiltrados com alta expressão de genes relacionados a células T citotóxicas e células Th1, apresentavam uma alta taxa de sobrevivência.

A resposta Th17 tem sido eficiente no combate a infecções por diferentes microrganismos como bactérias, fungos e vírus. Sua atividade antimicrobiana já foi comprovada em estudos em que deficiência de células Th17 é um fator contribuinte para infecções por *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* (MA et al., 2008; MILNER et al., 2008; ISHIGAME et al., 2009, SAIJO et al., 2010). Presença de células Th17 em hepatocarcinoma originado do vírus da hepatite B está relacionada a uma maior taxa de sobrevida e remissão da doença (YAN et al., 2014).

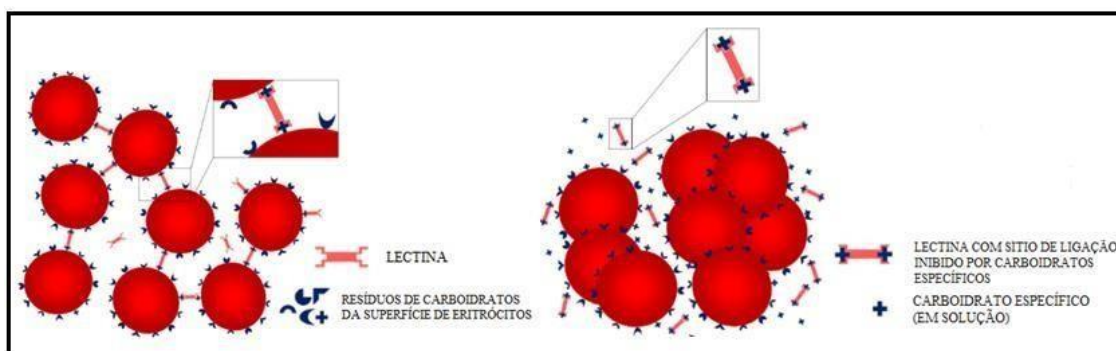
2.4 LECTINAS: DEFINIÇÃO, MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

As lectinas constituem um vasto grupo de proteínas que possuem diferentes estruturas, propriedades biológicas, características físico-químicas e têm como característica definidora a capacidade de reconhecimento de carboidratos de forma específica e reversível, sem alterar a estrutura covalente da molécula a qual se liga (LIU; BIAN; BAO, 2010; KARNCHANATAT et al., 2012; MACEDO et al., 2015). As lectinas são geralmente detectadas com base na sua capacidade de induzir a aglutinação de eritrócitos, fenômeno chamado de hemaglutinação (Figura 5) (NIZET; VARKI; AEBI, 2017). A inibição da atividade hemaglutinante na presença de açúcares livres em solução deve ser realizada para que seja confirmado que a aglutinação envolve o sítio de ligação

a carboidratos da superfície dos eritrócitos, bem como para identificar a especificidade da lectina (DAN et al., 2015; SATO et al., 2015).

Os domínios de ligação a carboidratos das lectinas interagem com mono, oligo ou polissacarídeos por meio de ligações não covalentes, como pontes de hidrogênio, interação de Van der Waals e interações hidrofóbicas (SHARON, 2007; SINGH; KAUR; SINGH, et al., 2015). As lectinas não tem origem imunológica, o que as diferencia das imunoglobulinas anti-carboidratos que também podem aglutinar células. Enquanto os anticorpos são estruturalmente semelhantes, as lectinas diferem na composição de aminoácidos, estrutura tridimensional e peso molecular e outras propriedades (COELHO et al., 2017).

FIGURA 5 - Representação da atividade hemaglutinante de lectinas.



À esquerda, a propriedade das lectinas de causar aglutinação de eritrócitos por reconhecimento de carboidratos específicos. À direita, está representada a inibição da atividade hemaglutinante: quando colocadas em contato com carboidratos livres na solução, as lectinas ligam-se a esses carboidratos e consequentemente não aglutinam os eritrócitos.

Fonte: Santos et al. (2014).

As lectinas foram inicialmente classificadas de acordo com a afinidade a carboidratos em: lectinas ligadoras de manose, *N*-acetilglicosamina, galactose, *N*-acetilgalactosamina, fucose ou ácido siálico (BARI et al., 2013; SANTOS et al., 2014). Porém, essa classificação não se aplica a todas as lectinas, já que algumas possuem a capacidade de se ligar apenas a açúcares complexos ou glicoconjugados (VAN DAMME; LANNOO, PEUMANS, 2008; AHMED; HMED; MOHAMMED; ANBAZHAGAN, 2015; SHANMUGAVEL et al., 2016).

Algumas lectinas que possuem na sua composição a presença de íons, que se mostram essenciais para a sua atividade biológica, sendo chamadas de

íon-dependentes. Lectinas tipo C, por exemplo, constituem uma grande família de lectinas dependentes de Ca^{2+} , importantes no papel de reconhecimento e eliminação de patógenos na imunidade inata (PAIVA et al., 2010; WANG et al., 2013). Há também relatos de outros cátions divalentes estimulando lectinas, tais como Mg^{2+} e Mn^{2+} (CARVALHO et al., 2013; ANTONYUK; LUTSYK, ANTONYUK, 2016). Ainda, há lectinas que não são totalmente dependentes de íons, mas que tem sua capacidade de reconhecer carboidratos estimulada na presença dos mesmos (HONG et al., 2015).

Entre as atividades biológicas das lectinas é possível mencionar ações imunomoduladora, antiviral, antifúngica, antibacteriana, antitumoral e inseticida (PATRIOTA et al., 2017; MITCHELL, RAMESSAR, O'KEEFE, 2017; JONES et al., 2017; SUN et al., 2016; CHEN et al., 2018; TATSUTA et al., 2018; MOURA et al., 2017). Há um crescente interesse na aplicação de lectinas vegetais na terapia de doenças humanas, como no desenvolvimento de agentes imunomoduladores e antitumorais (CUI et al., 2017, PERVIN et al., 2015).

A capacidade das lectinas de detectarem diferenças, mesmo que sutis, em estruturas de carboidratos presentes na superfície de células e em tecidos, estimula a avaliação dessas proteínas como ferramentas biológicas na pesquisa biomédica (PROCÓPIO et al., 2017a). As aplicações de lectinas na detecção de metástases tumorais foram relatadas nas últimas décadas (YANG et al., 2011). Pesquisas descrevem que o processo de metástase tumoral é sempre mediado por alterações de glicoproteínas nas membranas celulares, o que pode facilitar a migração de células cancerosas para locais secundários (DAN et al., 2013). Alterações na glicosilação celular podem ser estudadas utilizando lectinas e anticorpos monoclonais. Muitas lectinas são úteis para diferenciação de células tumorais e células normais (BLIXT et al., 2011; LI et al., 2011; DAN et al., 2013).

Antes de iniciar o estudo da atividade biológica propriamente dita de uma lectina, é necessário realizar uma purificação adequada, a fim de assegurar que as atividades biológicas detectadas estão sendo realmente desempenhadas pela lectina. Inicialmente, é feita a extração de proteínas do tecido-fonte, a qual deve ser realizada sob condições específicas de temperatura e tempo para que se obtenha um bom rendimento (RAFIQ et al., 2014; PROCÓPIO et al., 2017a). As lectinas podem ser purificadas através de

cromatografias utilizando-se diferentes tipos de fase estacionária, onde a escolha depende de características como tamanho molecular, carga iônica e afinidade por determinado carboidrato (POHLEVEN et al., 2012; VAN DAMME et al., 2014).

A cromatografia de troca iônica é baseada na carga da molécula em determinado valor de pH, ficando retidas na coluna as proteínas que possuem uma carga oposta à da matriz. A cromatografia de gel filtração separa proteínas de acordo com a diferença do tamanho molecular. A cromatografia de afinidade baseia-se na principal característica que as lectinas apresentam que é a capacidade de ligação a carboidratos: a matriz da coluna cromatográfica é constituída por um monossacarídeo, oligossacarídeo, polissacarídeo ou glicoconjugado ao qual a lectina possui afinidade (PROCÓPIO et al., 2017a; SINGH et al., 2014). O monitoramento da presença de lectinas durante o processo de purificação é feito através do ensaio de hemaglutinação (COELHO et al., 2017).

A eletroforese é uma técnica de separação de substâncias, sendo utilizada na identificação de pureza de proteínas, depois de realizadas as etapas anteriormente citadas. Uma mistura de proteínas é colocada em um suporte (papel ou um gel polimérico), o qual é submetido a uma diferença de potencial, onde moléculas carregadas migram a diferentes velocidades para o respectivo ânodo ou cátodo, a depender de sua carga (WESTERMEIER, 2017; ARMAREGO, 2017). Um tipo de eletroforese bastante utilizado em processos de purificação de proteínas é a eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, na presença do dodecil sulfato de sódio (SDS, do inglês *sodium dodecyl sulphate*). O SDS desnatura e adiciona carga negativa a todas as proteínas presentes na amostra, tornando todas as proteínas semelhantes, a não ser pelo peso molecular, propriedade que determinará a distância que migrarão no gel de poliacrilamida (KUMARI, NAGARAJU; MALLIKARJUNA, 2017; PAIVA et al., 2011).

2.4.1 Lectinas de plantas

As plantas são fontes ricas de lectinas, sendo essas proteínas extraídas facilmente de diversas partes, tais como cascas, folhas, frutas e sementes.

Pode-se obter diferentes lectinas em diferentes tecidos de uma mesma planta (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; VAN DAMME et al., 1998; BHAT et al., 2010; VAN DAMME et al., 2011; PROCÓPIO et al., 2017a). Há evidências de que algumas lectinas combinam uma função de proteína de armazenamento e papel na defesa das plantas contra patógenos e herbívoros (LANNO; VAN DAMME, 2014; DE HOFF et al., 2009).

As lectinas de plantas podem ser classificadas em doze famílias de proteínas de acordo com a sequência do seu domínio de reconhecimento de carboidratos. Essas famílias são: a família da aglutinina de *Agaricus bisporus*, as amarantinas, os homólogos das quitinases da classe V, a família da cianovirina, a família da aglutinina de *Euonymus europaeus*, a família da aglutinina de *Galanthus nivalis*, a família da heveína, as lectinas relacionadas à jacalina, as lectinas de leguminosas, a família de lectinas do domínio LysM, as lectinas semelhantes à da *Nictaba* e a família de lectinas do tipo ricina B. A família das lectinas leguminosas é a mais estudada e caracterizada atualmente (VAN DAMME 2008, JIANG et al., 2010).

Cada domínio de ligação a carboidratos é caracterizado por sua própria sequência de aminoácidos e dobramento. Contudo, alguns domínios podem mostrar reatividade semelhante em relação a estruturas de carboidrato, indicando que a especificidade não está exclusivamente ligada à ocorrência de um determinado domínio (VAN DAMME, 2008). As lectinas, no entanto, não são compostas apenas pelos domínios de ligação a carboidratos, possuindo outros domínios importantes para suas funções (VAN DAMME, 2014), fazendo com que as classificações baseadas em especificidade ao carboidrato ou estrutura tridimensional estejam sempre sendo complementadas utilizando-se outros parâmetros (VAN HOLLE; VAN DAMME, 2015).

Com base na estrutura molecular geral, as lectinas de plantas podem ser classificadas em merolectinas, que são lectinas que possuem apenas um domínio de ligação ao carboidrato, sendo, portanto incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células; hololectinas, que possuem mais de um domínio de ligação a carboidrato muito similares ou idênticos, podendo então induzir processos de precipitação e aglutinação; quimerolectinas, que contêm um domínio de ligação de carboidratos e outro domínio não relacionado, atuando independentemente; superlectinas, que são lectinas que possuem pelo

menos dois domínios de reconhecimentos a carboidratos distintos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; PEUMANS et al., 2001).

As atividades biológicas reportadas para as lectinas purificadas de plantas têm sido as mais diversas. WSMoL, lectina extraída das sementes de *Moringa oleifera*, possui atividades antibacteriana, inseticida e nematicida comprovadas (MOURA et al., 2015; MOURA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017; MEDEIROS et al., 2018). CasuL, uma lectina ácida e termoestável isolada de folíolos de *Calliandra surinamensis*, apresentou atividade citotóxica para células cancerosas e antimicrobiana, incluindo atividade antibiofilme (PROCÓPIO et al., 2017b). As lectinas de plantas mostraram propriedades anticancerígenas notáveis *in vivo* e *in vitro* e estudos clínicos mostraram que podem funcionar como uma alternativa na terapia do câncer (YAU et al., 2015). Um dos exemplos mais citados são as lectinas de visco, como a viscumina, testada em estudos clínicos de fase I utilizando tumores sólidos refratários a outros tratamentos. Um dos tipos de tumor estudados foi de bexiga e o tratamento com a lectina apresentou menos efeitos colaterais do que o imunoterápico mais utilizado para o caso. Foi observada remissão completa em 18% dos pacientes (ZWIERZINA et al., 2011).

2.4.2 Lectinas com atividade imunomoduladora

Lectinas atuam como imunomoduladores pela ligação específica à superfície de glicoproteínas de células imunológicas, o que pode induzir diversas respostas biológicas (LAUBLI et al., 2014; SARTIM; SAMPAIO, 2015; KATRLÍK et al., 2010; GAO et al., 2013; SUNG et al., 2013). Estudos indicam que lectinas podem modular a produção de determinadas citocinas e espécies reativas e induzem respostas imunes eficientes contra tumores e infecções microbianas (SILVA; CORREIA, 2014).

O efeito imunomodulador exercido por lectinas de plantas tem ação protetora contra infecções, como podemos mencionar na imunização contra *Leishmania* (PANUNTO-CASTELO et al., 2001; BARRAL-NETO et al., 1996; TEIXEIRA et al., 2006) e combate a infecções bacterianas e parasitárias através da modulação de citocinas (BATISTA et al., 2017; SOUZA et al., 2016). No campo da Cancerologia, os agentes imunoestimulantes constituem uma

terapia alternativa à quimioterapia convencional (BENMEBAREK et al., 2013). A Tabela 1 traz um resumo de algumas lectinas obtidas a partir de plantas, que apresentam efeito imunomodulatório sobre a produção de citocinas.

TABELA 1- Lectinas de plantas com atividade imunomoduladora

Lectinas (plantas)	Atividade imunomoduladora	Referências
Cramoll (<i>Cratylia mollis</i>)	Indução da produção de citocinas IFN- γ , IL-6, IL-17A, IL-22, IL-23 e IL-1 β ,	Melo et al. (2010); Oliveira et al. (2013); Silva et al. (2015).
ConA (<i>Canavalia ensiformis</i>)	Produção de IFN- γ , IL-12 e IL-10 TNF- α e IL-4	Melo et al. (2011). Li et al., (2016).
ConBr (<i>Canavalia brasiliensis</i>)	Produção de IFN- γ , IL-6 e IL-12 e liberação de NO	Andrade et al. (1999); Batista et al. (2017).
CFL (<i>Canavalia argentea</i>)	Indução de transcritos para IL-6, IL12 e IFN- γ	Batista et al. (2017).
ACA (<i>Allium cepa</i>)	Indução de resposta Th1 (através da produção de IFN- γ e IL-2)	Prasanna e Venkatesh (2015).
Artin M (<i>Artocarpus heterophyllus</i>)	Produção de IL-12 (desenvolvimento de resposta Th1)	Souza et al. (2013)
PHA (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Produção de IFN- γ e IL-2	Muraille et al. (1999)
PTL (<i>Pinellia ternata</i>)	Produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6	Yu et al. (2015)
Mistletoe lectins (<i>Viscum album</i>)	Liberação das citocinas IFN- γ , IL-4, IL- 13 and IL-17.	Saha et al., 2016
MvFL (<i>Microgramma vacciniifolia</i>)	Produção de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e NO	Patriota et al. (2017)
Jacalina (<i>Artocarpus heterophyllus</i>)	Indução de resposta Th1 (através da produção de IFN- γ e IL-6)	Buthia et al. (2009)
ScLL (<i>Synadenium carinatum</i>)	Produção de IFN- γ , IL-10, TNF- α , IL- 12 e IFN- γ	Rogério et al. (2007); Batista et al. (2017)

Fonte: elaborada pela autora

PTL é uma lectina obtida a partir de *Pinellia ternata*, planta bastante utilizada na medicina tradicional chinesa, que apresenta atividade antitumoral (ZUO et al., 2012). Esta lectina é capaz de ativar macrófagos, induzindo a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 de maneira dose e tempo dependente e também estimula a atividade quimiotática de neutrófilos (YU et al., 2015). A lectina de sementes de *Bauhinia bauhinioides*, denominada BBL, demonstrou

importantes efeitos vasodilatadores *in vivo*, como edema de curta duração e aumento da permeabilidade vascular (SILVA et al., 2011).

MvFL é uma lectina purificada de frondes de *Microgramma vacciniifolia* e apresentou capacidade de indução de perfil pró-inflamatório Th1, através de aumento da produção das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-6, bem como de óxido nítrico por células mononucleares de sangue periférico humano. Interessantemente, essa resposta foi acompanhada pelo estímulo da produção da citocina regulatória IL-10 (PATRIOTA et al., 2017).

ConBr, lectina obtida da planta *Canavalia brasilienses*, e CFL, purificada de *Cratylia argentea*, são potenciais fitoterápicos capazes de modular a cascata de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias e liberação de óxido nítrico em infecções sistêmicas causadas por *Salmonella* (SANTOS et al., 2016).

Artin M, lectina purificada da espécie *Artocarpus heterophyllus*, é capaz de reconhecer a porção N-glicano tanto no TLR2 e CD14, presentes em macrófagos, ligando-se a eles e iniciando um processo de ativação na membrana plasmática da célula imune. *In vitro*, essas interações desencadeiam a sinalização celular que leva à ativação de NF- κ B e produção da citocina IL-12 que induz uma resposta Th1 (MARIANO et al., 2014; RICCI-AZEVEDO, ROQUE-BARREIRA, GAY, 2017).

2.5 *Alpinia purpurata*

Alpinia purpurata pertence à família Zingiberaceae, subfamília Alpinioideae e tribo Alpinieae, sendo uma planta nativa da Ásia tropical e subtropical (KRESS et al., 2002). Essa família é composta por 1220 espécies de regiões tropicais, sendo *Alpinia* o maior gênero, com 200 espécies (ALBUQUERQUE; NEVES, 2004). A *A. purpurata* possui as variantes de brácteas rosas e vermelhas, esta última conhecida no Brasil popularmente como gengibre vermelho. É uma herbácea perene (Figura 6), internacionalmente conhecida como planta ornamental, sendo a maioria dos estudos sobre esta espécie voltada para melhorias de seu cultivo para obtenção de flores de corte (GONZALEZ; MOGOLLON, 2001; SANGWANANGKUL et al., 2008).

FIGURA 6 - *Alpinia purpurata*. Variante de brácteas vermelhas.



Além do potencial ornamental, *A. purpurata* tem sido descrita como fonte de moléculas bioativas. Óleo essencial extraído da inflorescência de *A. purpurata* apresentou uma variedade de efeitos biológicos incluindo efeitos antibacteriano, larvicida (contra *Aedes aegypti*) e antiviral para HIV (SANTOS *et al.*, 2012; FUKAI *et al.*, 2000). O óleo essencial das inflorescências de *A. purpurata* tem ainda potencial para ser usado como um inseticida contra o gorgulho do milho (*Sitophilus zeamais*), sendo essa atividade provavelmente devido a monoterpenos e monoterpenos oxigenados (LIRA *et al.*, 2015).

Em relação a propriedades medicinais, o rizoma da planta é conhecido por estimular o apetite, melhorar a voz e paladar, sendo também utilizado no tratamento de cefaléia, reumatismo, úlceras, dor de garganta e doenças renais (PRAJAPATHI *et al.*, 2003). Extratos aquoso, etanólico e de clorofórmio do rizoma da *A. purpurata* apresentam atividade antioxidante (SUBRAMANIAN; SUJA, 2011), bem como extratos preparados a partir de suas folhas apresentaram atividade antibacteriana para *Mycobacterium tuberculosis*, micobactéria causadora da tuberculose (VILLAFLORES *et al.*, 2010).

Tendo em vista que pesquisadores têm se dedicado cada vez mais ao isolamento de compostos presentes na *A. purpurata* e que as lectinas são importantes ferramentas de pesquisa na área de Bioquímica, Biologia Celular, Medicina e Imunologia, o presente trabalho investigou a presença de lectinas nas inflorescências dessa planta.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Purificar, caracterizar e avaliar a atividade imunomoduladora de lectina de inflorescência de *Alpinia purpurata*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estabelecer protocolo de purificação da lectina de inflorescência de *A. purpurata* (ApuL).
- b) Determinar a massa molecular nativa e a composição em subunidades da lectina.
- c) Determinar a especificidade de ligação a carboidratos de ApuL.
- d) Avaliar o efeito de variações de pH e temperatura na atividade hemaglutinante de ApuL.
- e) Determinar o efeito de cátions divalentes na atividade hemaglutinante da lectina.
- f) Investigar a citotoxicidade de ApuL para células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs).
- g) Avaliar a produção de citocinas e óxido nítrico por PBMCs tratados com a lectina.
- h) Avaliar o efeito da lectina na diferenciação e proliferação de linfócitos T.

4 CONCLUSÕES

ApuL é uma lectina purificada de inflorescências de *A. purpurata*, com massa molecular nativa de 34 kDa, afinidade pelas glicoproteínas fetuína e ovoalbumina, estável frente ao aquecimento a altas temperaturas (até 100°C), apresentando AH mais elevada em pH 7,5 e estimulada pelos cátions divalentes Ca^{2+} e Mg^{2+} .

ApuL não apresentou citotoxicidade para PBMCs em concentrações capazes de induzir a liberação de citocinas dos perfis Th1 (IFN- γ , TNF- α , IL-6) e Th17 (IL-17A), bem como de óxido nítrico por estas células. ApuL estimulou também a liberação de IL-10, uma citocina regulatória do processo inflamatório. Além disso, promoveu diferenciação e ativação de linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺. Sendo assim, a inflorescência de *A. purpurata* é fonte de uma lectina com ação imunomoduladora e potencial aplicação biomédica, o que adiciona valor biotecnológico a esta planta ornamental.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Basic Immunology**. 5^a ed., Elsevier, 2015.
- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**, 8^a ed., Saunders, 2014.
- ABBAS, A.K.; MURPHY, K.M.; Sher, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, v. 383, p.787-793, 1996.
- ACOSTA-RODRIGUEZ, E.V.; NAPOLITANI, G.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin17-producing human T helper cells. **Nature Immunology**, v. 8, p.942–949, 2007.
- AHMED, K.B.A.; MOHAMMED, A.S.; ANBAZHAGAN, V. Interaction of sugar stabilized silver nanoparticles with the T-antigen specific lectin, jacalin from *Artocarpus integrifolia*. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 145, p.110-116, 2015.
- AKDIS, C.A. Therapies for allergic inflammation: refining strategies to induce tolerance. **Nature Medicine**, v. 18, p.736–749, 2012.
- AL-ABD, A.M., ALJEHANI, Z.K., GAZZAZ, R.W., FAKHRI, S.H., JABBAD, ABDULRAHMAN, A.H., ALAHDAL, M., TORCHILIN, V.P. Pharmacokinetic strategies to improve drug penetration and entrapment within solid tumors. **Journal of Controlled Release**, v. 219, p. 269-277, 2015.
- ALBUQUERQUE, E.S.B.; NEVES, L.J. Anatomia foliar de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt & Smith (Zingiberaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, p.109–121, 2004.
- ANDRADE, J.L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; BARRAL-NETTO, M. Lectin-Induced Nitric Oxide Production. **Cellular Immunology**, v. 194, p. 98-102, 1999.
- ANTHONY, R. M.; KOBAYASHI, T.; WERMELING, F.; RAVETCH, J. V. Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel TH2 pathway. **Nature** v. 475, p.110–113, 2011.
- ANTONYUK, R., ALEXANDER LUTSYK, VOLODYMYR ANTONYUK. Lectin purification from carp roe (*Cyprinus carpio* L.), investigation of its carbohydrate specificity and application in histochemistry. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 57, 985–994, 2016.
- ANURADHA, R.; MUNISANKAR, S.; BHOOTRA, Y.; JAGANNATHAN, J.; DOLLA, C.; KUMARAN, P.; NUTMAN, T.B.; BABU, S. IL-10- and TGF β -

mediated Th9 Responses in a Human Helminth Infection. **SPLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, artigo e0004317, 2016.

ARMAREGO, W.L.F. **Purification of Laboratory Chemicals**, 8th Edition, Butterworth-Heinemann, 2017.

BARI, A.U.; SILVA, H.C.; SILVA, M.T.; JÚNIOR, F.N.P.; CAJAZEIRAS, J.B.; SAMPAIO, A.H.; LEAL, R.B.; TEIXEIRA, E.H.; ROCHA, B.A.; NASCIMENTO, K.S.; NAGANO, C.S.; CAVADA, B.S. Purification and partial characterization of a new mannose/glucose-specific lectin from *Dialium guineense* Willd seeds that exhibits toxic effect. **Journal of Molecular Recognition**, v. 26, p.351-356, 2013.

BARRAL-NETTO, M.; VON SOHSTENAM, R.L.; TEIXEIRA, M.; DOS SANTOS, W.L.; POMPEU, M.L.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.; CAVADA, B.S.; FALCOFF, E.; BARRAL, A. *In vivo* protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta Tropica**, v. 60, p. 237-250, 1996.

BASUDHAR, D.; SOMASUNDARAM, V.; OLIVEIRA, G.A.; KESARWALA, A.; HEINECKE, J.L.; CHENG, R.Y.; GLYNN, S.A.; WINK, D.A.; RIDNOUR, L.A. Nitric Oxide Synthase-2-Derived Nitric Oxide Drives Multiple Pathways of Breast Cancer Progression. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 26, p. 1044-1058, 2017.

BATISTA, J.; RALPH, M.T.; VAZ, R.V.; SOUZA, P.; SILVA, A.B.; NASCIMENTO, D.; SOUZA, L.T.; RAMOS, M.V.; MASTROENI, P.; LIMA-FILHO, J.V. Plant lectins ConBr and CFL modulate expression toll-like receptors, pro-inflammatory cytokines and reduce the bacterial burden in macrophages infected with *Salmonella enterica* serovar typhimurium. **Phytomedicine**, v. 15, p. 52-60, 2017.

BERNINK, J.; MJOËSBERG, J.; SPITS, H. Th1- and Th2-like subsets of innate lymphoid cells. **Immunological Reviews**, v. 252, p.133–138, 2013.

BHAT, G. G.; SHETTY, K. N.; NAGRE, N. N.; NEEKHRA, V. V.; LINGARAJU, S.; BHAT, R. S.; INAMDAR, S. R.; SUGUNA, K.; SWAMY, B. M. Purification, characterization and molecular cloning of a monocot mannose-binding lectin from *Remusatia vivipara* with nematicidal activity. **Glycoconjugate Journal**, v. 27, p. 309–320, 2010.

BHUTIA, S.K.; MALLICK, S.K.; MAITI, T.K. *In vitro* immunostimulatory properties of Abruslectins derived peptides in tumor bearing mice. **Phyton International Journal of Experimental Botany**, v. 16, p. 776–782, 2009.

BLIXT, O.; BUETI, D.; BURFORD, B.; ALLEN, D.; JULIEN, S.; HOLLINGSWORTH, M.; GAMMERMAN, A.; FENTIMAN, I.; TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J.; BURCHELL, J.M. Autoantibodies to aberrantly glycosylated MUC1 in early stage breast cancer are associated with a better prognosis. **Breast Cancer Research**, v. 13, artigo R25, 2011.

BOTTAZZI, B.; DONI, A.; GARLANDA, C.; MANTOVANI, A. An integrated view of humoral innate immunity: pentraxins as a paradigm. **Annual Review of Immunology**, v. 28, p. 157-183, 2010.

BUTLE, A.; TALMALE, S.; PATIL, M.B. Potential *In vivo* Immunomodulatory Effects of the most Active Lectin Isolated from Seeds of *Zizyphus oenoplia*. **Journal of Clinical and Cellular Immunology**, v. 7, artigo 386, 2016.

CARVALHO, A.S.; SILVA, M.V.; GOMES, F.S.; PAIVA, P.M.G.; MALAFAIA, C.B.; SILVA, T.D.; VAZ, A.F.M.; SILVA, A.G.; ARRUDA, I.R.S.; NAPOLEÃO, T.H.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M.G.; CORREIA, M.T.S. Purification, characterization and antibacterial potential of a lectin isolated from *Apuleia leiocarpa* seeds. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, p. 832-842, 2013.

[CASTILLO, P.; KOLLS, J.K. IL-10: A paradigm for Counterregulatory cytokines. **Journal of Immunology**, v. 197, p. 1529-1530, 2016.

CHEN, Z.; ANDREEV, D.; OESER, K.; KRLJANAC, B.; HUEBER, A.; KLEYER, A.; VOEHRINGER, A.; SCHETT, G.; BOZEC, A. Th2 and eosinophil responses suppress inflammatory arthritis. **Nature Communications**, v. 7, artigo 11596, 2016.

CHEN, C.; CHEN, C.; RAVINATH, D.M.; BUNGAHOT, A.; CHENG, C.; YOU, R.; Functional characterization of chitin-binding lectin from *Solanum integrifolium* containing anti-fungal and insecticidal activities. **BMC Plant Biology**, v. 18, artigo 3, 2018.

CIRACI, C.; JANCZY, J.R.; JAIN, N.; HAASKE, S.; SILVA, S.P.; BENJAMIM, C.F.; SADLER, J.J.; OLIVIER, A.K.; IWAKURA, Y.; SHAYAKHMETOV, D.M.; SUTTERWALA, F.S.; CASSEL, S.L. Immune Complexes Indirectly Suppress the Generation of Th17 Responses In Vivo. **PLoS One**, v. 11, artigo e0151252., 2016.

COELHO, L.C.B.B.; SILVA, P.M.S.; LIMA, V.L.M.; PONTUAL, E.V.; PAIVA, P.M.G.; NAPOLEÃO, T.H.; CORREIA, M.T.S. Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, artigo 1594074, 2017.

COSMI, L.; DE PALMA, R.; SANTARLASCI, V.; MAGGI, L.; CAPONE, M.; FROSALI, F. Human interleukin17- producing cells originate from a CD161+CD4+Tcell precursor. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, p.1903–1916, 2008.

COSMI, L.; MAGGI, L.; SANTARLASCI, V.; LIOTTA, F.; ANNUNZIATO, F. T helper cells plasticity in inflammation. **Cytometry Part A**, v. 85, p. 36-42, 2014.

CROME, S. Q.; WANG, A. Y.; LEVINGS, M. K. Translational Mini-Review Series on Th17 Cells: Function and regulation of human T helper 17 cells in

health and disease. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 159, p.109–119, 2010.

CRUVINEL, W.M.; ARAÚJO, J.J.A.P.; CATELAN, T.T.T.; SOUZA, A.W.S.; SILVA, N.P.; ANDRADE, L.E.C. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, p. 434-461, 2010.

CUI, B.; LI, L.; ZENG, Q.; LIN, F.; YIN, L.; LIAO, L.; HUANG, M.; WANG, J. A novel lectin from *Artocarpus lingnanensis* induces proliferation and Th1/Th2 cytokine secretion through CD45 signaling pathway in human T lymphocytes. **Journal of Natural Medicine**, v. 71, p. 409-421, 2017.

D'ARGENIO, D.A.; WILSON, C.B. A decade of vaccines: Integrating immunology and vaccinology for rational vaccine design. **Immunity**, v. 33, p. 437–440, 2010.

DALMAS, E.; TORDJAN, J.; GUERRE-MILLO, M.; CLÉMENT, K. Macrophages and inflammation. In: SYMONDS, M. (Ed.), **Adipose Tissue Biology**, Springer International Publishing, 2017 pp. 299-255.

DAN, X.; WONG, J.; FANG, E.F.; CHAN, F.C.W.; NG, T.B. Purification and Characterization of a Novel Hemagglutinin with Inhibitory Activity toward Osteocarcinoma Cells from Northeast China Black Beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 3903-3914, 2015.

DAN, X.L.; NG, T.B. Lectins in human cancer: both a devil and an angel?. **Current Protein & Peptide Science**, v. 14, p. 481–491, 2013.

DE HOFF, P.L.; BRILL, L.M.; HIRSCH, A.M. Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 282, p. 1–15, 2009.

DENG, Y.; WANG, Z.; CHANG, C.; LU, L.; SING LAU, C.; LU, Q. Th9 cells and IL-9 in autoimmune disorders: Pathogenesis and therapeutic potentials. **Human Immunology**, v. 78, p. 120-128, 2017.

DONG, C. Genetic controls of Th17 cell differentiation and plasticity. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 43, p. 1–6, 2011.

DONI, A.; D'AMICO, G.; MORONE, D.; MANTOVANI, A.; GARLANDA, C. Humoral innate immunity at the crossroad between microbe and matrix recognition: The role of PTX3 in tissue damage. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 61, p. 31-40, 2017.

DUQUE, G.A., DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 7, artigo 491, 2014.

ESQUIVEL-VELÁZQUEZ, M.; OSTOA-SALOMA, P.; PALACIOS-ARREOLA, M.I.; NAVA-CASTRO, K.E.; CASTRO, J.I.; MORALES-MONTOR J. The Role of Cytokines in Breast Cancer Development and Progression. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 35, p. 1-16, 2015.

FAIR, R.J., TOR, Y. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. **Perspectives in Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 25–64, 2014.

FERLAZZO, G.; MORANDI, B. Cross-talks between natural killer cells and distinct subsets of dendritic cells. **Frontiers in Immunology**, v. 5, artigo 159, 2014.

FINLAY, C.M.; STEFANSKA, A.M.; WALSH, K.P.; KELLY, P.J.; BOON, L.; LAVELLE, E.D.; WALSH, P.T.; MILLS, K.H.G. Helminth Products Protect against Autoimmunity via Innate Type 2 Cytokines IL-5 and IL-33, which promote eosinophilia. **Journal of Immunology**, v. 196, p. 703-714, 2016.

FRIDMAN, W. H.; PAGÈS, F.; SAUTÈS-FRIDMAN, C.; GALON, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, p. 298–306, 2012.

FUKAI, T.; SAKAGAMI, H.; TOGUCHI, M.; et al. Cytotoxic activity of low molecular weight polyphenols against human oral tumor cell lines. **Anticancer Research**, v. 20, p. 2525–2536, 2000.

GAFFEN, S.L.; JAIN, R.; GARG, A.V.; CUA, D.J. The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, p. 585–600, 2014.

GAO, S.; ZHOU, J.; LIU, N.; WANG, L.; GAO, Q.; WU, Y.; ZHAO, Q.; LIU, P.; WANG, S.; LIU, Y.; GUO, N.; SHEN, Y.; WU, Y.; YUAN, Y. Curcumin induces M2 macrophage polarization by secretion IL-4 and/or IL-13. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 85, p. 131-139, 2015.

GARDINER, C.M.; MILLS, K.H. The cells that mediate innate immune memory and their functional significance in inflammatory and infectious diseases. **Seminars in Immunology**, v. 28, p. 343–50, 2016.

GONZÁLEZ, M.; MOGOLLÓN, N. Fertilización nitrogenada sobre el crecimiento y desarrollo de la inflorescencia en plantas de *Alpinia purpurata* (Vieill.) K. Schum. "Jungle King"™ provenientes de cultivo in vitro y de sección de rizoma. **Revista de la Facultad de Agronomía LUZ**, v.18, p. 124-134, 2001.

HAYDEN, M.S.; GHOSH, S. Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. **Seminars in Immunology**, v. 26, p. 253-266, 2014.

ZWIERZINA, H.; BERGMANN, L.; FIEBIG, H.; AAMDAL, S.; SCHÖFFSKI, P.; WITTHOHN, K.; LENTZEN, H. The preclinical and clinical activity of aviscumine: A potential anticancer drug. **European Journal of Cancer**, v. 47, p.1450-1457, 2011.

HEREDIA, J. E.; MUKUNDAN, L.; CHEN, F.M.; MUELLER, A.A.; DEO, R.C.; LOCKSLEY, R.M.; RANDO, T.A.; CHAWLA, A. Type 2 innate signals stimulate fibro/adipogenic progenitors to facilitate muscle regeneration. **Cell**, v. 153, p. 376–388, 2013.

HE, X.; SMEETS, R.L.; RIJSSEN, E.V.; BOOTS, A.M.H.; JOOSTEN, I.; KOENEN, H.J.P.M.; Single CD28 stimulation induces stable and polyclonal expansion of human regulatory T cells. **Scientific Reports**, v. 7, artigo 43003, 2017.

HIROTA, K.; DUARTE, J.H.; VELDHOFEN, M.; HORNSBY, E.; LI, Y.; CUA, D.J.; AHLFORS, H.; WILHELM, C.; TOLAINI, M.; MENZEL, U.; GAREFALAKI, A.; POTOCHNIK, A.J.; STOCKINGER, B. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. **Nature Immunology**, v. 12, p. 255–263, 2011.

HONG, J.; CHEN, T.; HU, L.; YANG, J.; HU, P.; WANG, S. Purification and Characterization of a Novel Lectin from Chinese Leek Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 1488-1495, 2015.

ISHIGAME, H.; KAKUTA, S.; NAGAI, T.; KADOKI, M.; NAMBU, A.; KOMIYAMA, Y.; FUJIKADO, N.; TANAHASHI, Y.; AKITSU, A.; KOTAKI, H.; SUDO, K.; NAKAE, S.; SASAKAWA, C.; IWAKURA, Y. Show more Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucocutaneous bacterial infection and allergic responses. **Immunity**, v. 30, p.108–119, 2009.

IVASHKIV; L.B.; DONLIN, L.Y. Regulation of type I interferon responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, p. 36–49, 2014.

JANKOVIC, D.; FENG, C.G. CD4⁺ T Cell Differentiation in Infection: Amendments to the Th1/Th2 Axiom. **Frontiers in Immunology**, v. 6, artigo 198, 2015.

JENABIAN, M.; SEDDIKI, N.; YATIM, A.; CARRIERE, M.; HULIN, A.; YOUNAS, M.; GHADIMI, E.; KÖK, A.; ROUTY, J.; TREMBLAY, A.; SÉVIGNY, J.; LELIEVRE, J.; LEVY, Y. Regulatory T cells negatively affect IL-2 production of effector T cells through CD39/adenosine pathway in HIV infection. **PLoS Pathogens**, v. 9, artigo 1003319, 2013.

JIANG, S.Y.; MA, S.; RAMACHANDRAN, S. Evolutionary history and stress regulation of the lectin superfamily in higher plants. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, artigo 79, 2010.

JIN, W.; DONG, CH. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. **Emerging Microbes & Infections**, v. 2, artigo e60, 2013.

JONES, T.H.; MCCLELLAND, E.E.; MCFEETERS, H.; MCFEETERS, R.L. Novel Antifungal Activity for the Lectin Scytovirin: Inhibition of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, artigo 755, 2017.

KAPLAN, A.P. Enzymatic pathways in the pathogenesis of hereditary angioedema: the role of C1 inhibitor therapy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 126, p. 918–925, 2010.

KAPLAN, M.H. Th9 cells: differentiation and disease. **Immunological Reviews**, v. 252, p.104-115, 201, 2013.

KAPLAN, M.H.; HUFFORD, M.M.; OLSON, M.R. The development and in vivo function of T helper 9 cells. **Nature Reviews. Immunology**, v. 15, p. 295–307, 2015.

KARNCHANATAT, A. Antimicrobial Activity of Lectins from Plants. **Antimicrobial Agents**, v. 8, p. 145-178, 2012.

KATRLÍK, J.; ŠVITEL, J.; GEMEINER, P.; KOŽÁR, T.; TKAC, J. Glycan and lectin microarrays for glycomics and medicinal applications. **Medicinal Research Reviews**, v. 30, p. 394-418, 2010.

KOLEV, M.; LE FRIEC, G.; KEMPER, C. The role of complement in CD4(+) T cell homeostasis and effector functions. **Seminars in Immunology**, v. 25, p. 12–19, 2013.

KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V.K. IL-17 and Th17 Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 27, p. 485–517, 2009.

KOVACEVIC, Z.; SAHNI, S.; LOK, H.; DAVIES, M.J.; WINK, D.A.; RICHARDSON, D.R. Regulation and control of nitric oxide (NO) in macrophages: Protecting the "professional killer cell" from its own cytotoxic arsenal via MRP1 and GSTP1. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1861, p. 995-999, 2017.

KLOCKE, K.; HOLMDAHL, R.; WING, K. CTLA-4 expressed by FOXP3+ regulatory T cells prevents inflammatory tissue attack and not T-cell priming in arthritis. **Immunology**, v. 152, p. 125-137, 2017.

KRESS, W.J.; LIU, A.; NEWMAN, M.; LI, Q. The molecular phylogeny of *Alpinia* (Zingiberaceae): a complex and polyphyletic genus of gingers. **American Journal of Botany**, v.92, p. 167-178, 2005.

KUMAR, H.; BOT, A. Celular and molecular mechanisms orchestrating the innate immunity during infectious and non-infectious disease. **International Reviews of Immunology**, v. 35, p. 369- 371, 2016

KUMARI, N.B.N.; NAGARAJU, B.; MALLIKARJUNA, K. Biochemical characterization and protein profile by SDS-page of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) associated Rhizobia. **Innovat International Journal Of Medical & Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 8-13, 2017.

LANGRISH, C.L.; CHEN, Y.; BLUMENSCHNIG, W.M.; MATTSON, J.; BASHAM, B.; SEDGWICK, J.D.; MCCLANAHAN, T.; KASTELEIN, R.A.; CUA, D.J. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, p. 233–240, 2005.

LANNOO, N.; VAN DAMME, E.J.M. Lectin domains at the frontiers of plant defense. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, artigo 397, 2014.

LÄUBLI, H.; ALISSON-SILVA, F.; STANCZAK, M.A.; SIDDIQUI, S.S.; DENG, L.; VERHAGEN, A.; VARKI, N.; VARKI, A. Lectin Galactoside-binding Soluble 3 Binding Protein (LGALS3BP) Is a Tumor-associated Immunomodulatory Ligand for CD33-related Siglecs. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, p. 33481-33491, 2014.

LEXBERG, M.H.; TAUBNER, A.; ALBRECHT, I.; LEPENIES, I.; RICHTER, A.; KAMRADT, T.; RADBRUCH, A.; CHANG, H. IFN- γ and IL-12 synergize to convert in vivo generated Th17 into Th1/Th17 cells. **European Journal of Immunology**, v. 40, p. 3017–3027, 2010.

LI, X.; LIU, H.; YAO, Q.; XU, B.; ZHANG, S.; TU, C. Quercetin Protects Mice from ConA-Induced Hepatitis by Inhibiting HMGB1-TLR Expression and Down-Regulating the Nuclear Factor Kappa B Pathway. **Inflammation**, v. 39, p. 96-106, 2016.

LI, Y.; TAO, S.C.; BOVA, G.S.; LIU, A.Y.; CHAN, D.W.; ZHU, H.; ZHANG, H. Detection and verification of glycosylation patterns of glycoproteins from clinical specimens using lectin microarrays and lectin-based immunosorbent assays. **Anal Chemistry**, v. 83, p. 8509–8516, 2011.

LICONA-LIMON, P.; KIM, L.K.; PALM, N.W.; FLAVELL, R.A. TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. **Nature immunology**, v. 14, p. 536-542, 2013.

LIRA, C.S.; PONTUAL, E.V.; ALBUQUERQUE, L.P.; PAIVA, L.M.; PAIVA, P.M.G.; OLIVEIRA, J.V.; NAPOLEÃO, T.H.; NAVARRO, D.M.A.F. Evaluation of the toxicity of essential oil from *Alpinia purpurata* inflorescences to *Sitophilus zeamais* (maize weevil). **Crop Protection**, v. 71, p. 95-100, 2015.

LIS, H.; SHARON, N. The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). **Annual Review Biochemistry**, v. 42, p. 541-574, 1973.

LIU, B.; BIAN, H.; BAO, J. Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. **Cancer Letters**, v. 287, p. 1-12, 2010.

LO FARO, M. L.; FOX, B.; WHATMORE, J. L.; WINYARD, P. G.; WHITEMAN, M. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 41, p. 38–47, 2014.

LOI, S.; MICHELIS, S.; SALGADO, R.; SIRTAIN, N.; JOSE, V.; FUMAGALLI, D.; KELLOKUMPU-LEHTINEN, P.; BONO, P.; KATAJA, V.; DESMEDT, C.; PICCART, M. J.; LOIBL, S.; DENKERT, C.; SMYTH, M. J.; JOENSUU, H.; SOTIRIOU, C. Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER Trial. **Annals of Oncology**, v. 25, p. 1544–1550, 2014.

LOK, H.C.; RAHMANTO, Y.S.; HAWKINS, C.L.; KALINOWSKI, D.S.; MORROW, C.S.; TOWNSEND, A.J.; PONKA, P.; RICHARDSON, D.R. Nitric oxide storage and transport in cells are mediated by glutathione S-transferase P1-1 and multidrug resistance protein 1 via dinitrosyl iron complexes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p. 607-618, 2012.

LOK, H.C.; SAHNI, S.; RICHARDSON, V.; KALINOWSKI, D.S.; KOVACEVIC, Z.; LANE, D.J.; RICHARDSON, D.R. Glutathione S-transferase and MRP1 form an integrated system involved in the storage and transport of dinitrosyl-dithiolato iron complexes in cells, *Free Radic. Biology and Medicine*, v. 5, p. 14-29, 2014.

MA, C.S.; CHEW, G.Y.; SIMPSON, N.; PRIYADARSHI, A.; WONG, M.; GRIMBACHER, B.; FULCHER, D.A.; TANGYE, S.G.; COOK, M.C. Deficiency of Th17 cells in hyper IgE syndrome due to mutations in STAT3. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, p. 1551–1557, 2008.

MACEDO, M.L.R.; OLIVEIRA, C.F.R.; OLIVEIRA, C.T. Insecticidal Activity of Plant Lectins and Potential Application in Crop Protection. **Molecules**, v.20(2), p.2014-2033, 2015.

MANEL, N.; UNUTMAZ, D.; LITTMAN, D.R. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta induction of the nuclear receptor ROR gamma. **Nature Immunology**, v. 9, p.641–649, 2008.

MANTOVANI, A.; CASSATELLA, M.A.; COSTANTINI, C.; JAILLON, S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, p. 519–531, 2011.

MANTOVANI, A.; BISWAS, S.K.; GALDIERO, M.R.; SICA, A.; LOCATI, M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling, **The Journal of Pathology**, v. 229, p.176–185, 2013.

MARIANO, V.S.; ZORZETTO-FERNANDES. A.L.; DA SILVA. T.A.; RUAS, L.P.; NOHARA, L.L.; DE ALMEIDA, I.C. Recognition of TLR2 N-glycans: critical role in ArtinM immunomodulatory activity. **PLoS One**, v. 9, artigo e98512, 2014.

MARQUES, G.S., SILVA, C.C.A.R., VILELA, W.T., FIGUEIRÊDO, C.B.M., SILVA, A.C.A.F., SILVA, R.M.F., NETO, P.J.R. Plantas medicinais como alternativa terapêutica para aumento da resistência imunológica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, p. 27-33, 2015.

MEDEIROS, M.L.S.; MOURA, M.C.; NAPOLEÃO, T.H.; PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B.; BEZERRA, A.C.D.S.; SILVA, M.D.C. Nematicidal activity of a water soluble lectin from seeds of *Moringa oleifera*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 782-789, 2018.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Innate immunity. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, p. 338-344, 2000.

MELO, C.M.L.; CASTRO, M.C.A.B.; OLIVEIRA, A.P.; GOMES, F.O.S.; PEREIRA, V.A.R.; 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**, v. 24, p.1631-1636, 2010.

MELO, C.M.L.; MELO, H.; CORREIA, M.T.S.; COELHO, L.C.B.B.; 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**, v. 73, 112–121, 2011.

MERLE, N.S.; CHURCH, S.E.; FREMEAUX-BACCHI, V.; ROUMENINA, L.T. Complement system part i – molecular mechanisms of activation and regulation. **Frontiers in Immunology**, v. 6, artigo 262, 2015.

MILNER, J.D.; BRENCHELEY, J.M.; LAURENCE, A.; FREEMAN, A.F.; HILL, B.J.; ELIAS, K.M.; KANNO, Y.; SPALDING, C.; ELLOUMI, H.Z.; PAULSON, M.L.; DAVIS, J.; HSU, A.; ASHER, A.I.; O'SHEA, J.; HOLLAND, S.M.; PAUL, W.E.; DOUEK, D.C. Impaired TH17 cell differentiation in subjects with autosomal dominant hyper-IgE syndrome. **Nature**, v. 452, p.773–776, 2008.

MIRCHANDANI, A.S.; BESNARD, A.; YIP, E.; SCOTT, C.; BAIN, C.C.; CEROVIC, V.; SALMOND, R.J.; LIEW, F.Y. Type 2 Innate Lymphoid Cells Drive CD4+ Th2 Cell Responses. **Journal of Immunology**, v. 192, p. 2442-2448, 2014.

MISIAK, A.; WILK, M.M.; RAVERDEAU, M.; MILLS, K.H.G. IL-17–producing innate and pathogen-specific tissue resident memory gd T cells expand in the lungs of Bordetella pertussis–infected mice. **Journal of Immunology**, v. 198, p. 363–374, 2017.

MITCHELL, C.A.; RAMESSAR, K.; O'KEEFE, B.R. Antiviral lectins: Selective inhibitors of viral entry. **Antiviral Research**, v. 142, p. 37-54, 2017.

MOORE, K.W.; MALEFYT, R.W.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 683-765, 2009.

MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clones. 1. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of Immunology**, v. 136, p. 2348–2357, 1986.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Review of Immunology**, v. 7, p. 145–173, 1989.

MOUGIAKAKOS, D.; CHOUDHURY, A.; LLADSER, A.; KIESSLING, R.; JOHANSSON, C.C. Regulatory T cells in cancer. **Advances in Cancer Research**, v.107, p. 57–117, 2010.

MOURA, M.C.; NAPOLEÃO, T.H.; CORIOLANO, M.C.; PAIVA, P.M.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; COELHO, L.C. Water-soluble *Moringa oleifera* lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, p. 666-676, 2015.

MOURA, M.C.; TRENTIN, D.S.; NAPOLEÃO, T.H.; PRIMON-BARROS, M., XAVIER, A.S.; CARNEIRO, N.P.; PAIVA, P.M.G.; MACEDO, A.J.; COELHO, L.C.B.B. Multi-effect of the water-soluble *Moringa oleifera* lectin against *Serratia marcescens* and *Bacillus* sp.: antibacterial, antibiofilm and anti-adhesive properties. **Journal of Applied Microbiology** v. 123, p. 861-874, 2017.

MURAILLE, E.; PAJAK, B.; URBAIN, J.; LEO, B. Carbohydrate-Bearing Cell Surface Receptors Involved in Innate Immunity: Interleukin-12 Induction by Mitogenic and Nonmitogenic Lectins. **Cellular Immunology**, v. 191, p. 1-9, 1999.

NASRI, H.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Medicinal Plants And Antioxidants: Why They Are Not Always Beneficial? **Iranian Journal of Public Health**, v. 43, p. 255–257, 2014.

NEURATH, M.F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, p. 329–342, 2014.

NIZET, V.; VARKI, A.; AEBI, M. Microbial Lectins: Hemagglutinins, Adhesins, and Toxins. 2017. **Essentials of Glycobiology** [Internet]. 3th Edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2017.

NOELLE, R.J.; NOWAK, E.C. Cellular sources and immune functions of interleukin-9. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 683-687, 2010.

NOURI, H.R., VARASTEH, A.; JAAFARI, M.R.; DAVIES, J.M.; SANKIAN, M. Induction of a Th1 immune response and suppression of IgE via immunotherapy with a recombinant hybrid molecule encapsulated in liposome–

protamine–DNA nanoparticles in a model of experimental allergy. **Immunologic Research**, v. 62, p. 280–291, 2015.

OCHI, A.; NGUYEN, A.H.; BEDROSIAN, A.S.; MUSHLIN, H.M.; BARILLA, S.Z.R.; ZAMBIRINIS, C.P.; FALLON, N.C.; REHMAN, A.; PYLAYEVA-GUPTA, Y.; BADAR, S.; HAJDU, C.H.; FREY, A.B.; BAR-SAGI, D.; MILLER, G. MyD88 inhibition amplifies dendritic cell capacity to promote pancreatic carcinogenesis via Th2 cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 209, p. 1671-87, 2012.

OFFRINGA, R.; GLENNIE, M.J. Development of Next-Generation Immunomodulatory Antibodies for Cancer Therapy through Optimization of the IgG Framework. **Cancer Cell**, v. 28, p. 273-275, 2015.

OLIVEIRA, C.F.R.; MOURA, M.C.; NAPOLEÃO, T.H.; PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B.; MACEDO, M.L.R. A chitin-binding lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) impairs the digestive physiology of the Mediterranean flour larvae, *Anagasta kuehniella*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.142, p.67-76, 2017.

OLIVEIRA, P.S.; RÊGO, M.J.; DA SILVA, R.R.; CAVALCANTI, M.B.; GALDINO, S.L.; CORREIA, M.T.; COELHO, L.C.; PITTA, M.G. 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, artigo 263968, 2013.

OSBORNE, L. C. et al. Coinfection. Virus-helminth coinfection reveals a microbiota-independent mechanism of immunomodulation. **Science**, v. 345, p. 578–582, 2014.

PAHAM, P. Co-evolution of lymphocyte receptors with MHC class I. **Immunological Reviews**, v. 267, p. 1-5, 2015.

PAIVA, P. M. G.; NAPOLEÃO, T. H.; SANTOS, N. D. L.; CORREIA, M. T. S.; NAVARRO, D. M. A. F.; COELHO, L. C. B. B. Plant compounds with Aedes Aegypti larvicidal activity and other biological properties. **Bioprocess Sciences and Technology**, Nova Science Publishers, New York, 2011, pp. 271–296,

PALM, N. W.; ROSENSTEIN, R. K.; MEDZHITOV, R. Allergic host defences. **Nature**, v. 484, p.465–472, 2012.

PAN, H.F.; LENG, R.X.; LI, X.P.; ZHENG, S.G.; YE, D.Q. Targeting T-helper 9 cells and interleukin-9 in autoimmune diseases. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v. 24, p. 515–522, 2013.

PANUNTO-CASTELO, A.; SOUZA, M.A.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; SILVA, J.S. KM+, a lectin from Artocarpus integrifolia, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against Leishmania major antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. **Glycobiology**, v. 11, p. 1035–1042, 2001.

PATRIOTA, L.L.S.; PROCÓPIO, T.F.; BRITO, J.S.; SEBAG, V.; OLIVEIRA, A.P.S.; SOARES, A.K.A.; MOREIRA, L.R.; LIMA, T.A.; SOARES, T.; SILVA, T.D.; PAIVA, P.M.G.; LORENA, V.M.B.; MELO, C.M.L.; ALBUQUERQUE, L.P.; NAPOLEÃO, T.H. *Microgramma vacciniifolia* (Polypodiaceae) fronds contain a multifunctional lectin with immunomodulatory properties on human cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 36-46, 2017.

PECK, A.; MELLINS, E.D.; Breaking old paradigms: Th17 cells in autoimmune arthritis. **Clinical Immunology**, v. 132, p. 295-304, 2009.

PERVIN, M.; KOYAMA, Y.; ISEMURA, M.; NAKAMURA, Y. Plant Lectins in Therapeutic and Diagnostic Cancer Research. **International Journal of Plant Biology**, v. 3, artigo 1030, 2015.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 491, p. 27-54, 2001.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Lectins as Plant Defense Proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 347–352, 1995.

PFEFFER, P.E.; HO, T.R.; MANN, E.H.; KELLY, F.J.; SEHLSTEDT, M.; POURAZAR, J.; DOVE, R.E.; MUDWAY, T.S.I.S.; HAWRYLOWIC, C.M. Urban particulate matter stimulation of human dendritic cells enhances priming of naive CD8 T lymphocytes. **Immunology**, doi: 10.1111/imm.12852, 2017.

POTIAN, J. A.; RAFI, W.; BHATT, K.; MCBRIDE, A.; GAUSE, W.C.; SALGAME, P. Preexisting helminth infection induces inhibition of innate pulmonary antituberculosis defense by engaging the IL-4 receptor pathway. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 208, p. 1863–1874, 2011.

PRAJAPATHI, N.D.; PUROHIT, S.S.; ARUN, K.S; KUM, A. Handbook of medicinal plants. **Agrobios India**, 2003, p. 35,

PRASANNA, V.K.; VENKATESH, Y.P. Characterization of onion lectin (*Allium cepa* agglutinin) as an immunomodulatory protein inducing Th1-type immune response *in vitro*. **International Immunopharmacology**, v. 26, p. 304-313, 2015.

PROCÓPIO, T.F.; MOURA, M.C.; ALBUQUERQUE, L.P.; GOMES, F.S.; SANTOS, N.D.L.; COELHO, L.C.B.B.; PONTUAL, E.V.; PAIVA, P.M.G.; NAPOLEÃO, T.H. Antibacterial lectins: Action mechanisms, defensive roles, and biotechnological potential. In: COLLINS, E. (ed.) **Antibacterials: synthesis, properties, and biological activities**, Nova Science Publishers, New York, 2017a, pp. 69-90.

PROCÓPIO, T.F.; PATRIOTA, L.L.S.; MOURA, M.C.; DA SILVA, P.M.; DE OLIVEIRA, A.P.; CARVALHO, L.V.N.; LIMA, T.A.; SOARES, T.; DA SILVA, T.D.; COELHO, L.C.B.B.; PITTA, M.G.R.; RÊGO, M.J.M.;

FIGUEIREDO, R.C.B.Q.; PAIVA, P.M.G.; NAPOLEÃO, T.H. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 419-429, 2017b.

PULEDRAN, B. Systems vaccinology: Probing humanity's diverse immune systems with vaccines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, p. 12300-12306, 2014.

PURWAR, R.; SCHLAPBACH, C.; XIAO, S.; KANG, H.S.; ELYAMAN, W.; JIANG, X.; JETTEN, A.M.; KHOURY, S.J.; FUHLBRIGGE, R.C.; KUCHROO, V.K.; CLARK, R.A.; KUPPER, T.S. Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. **Nature Medicine**, v. 18, p. 1248–1253, 2012.

RAFIQ, S.; QADIR, S.; WANI, I.H.; GANIE, S.A.; MASOOD, A.; HAMID, R. Purification and partial characterization of a Fructose-binding lectin from the leaves of *Euphorbia helioscopia*. Pak. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, p. 1805-1810 2014.

RAHMANTO, Y.S.; KALINOWSKI, D.S.; LANE, D.J.; LOK, H.C.; RICHARDSON, V.; RICHARDSON, D.R. Nitrogen monoxide (NO) storage and transport by dinitrosyl-dithiol-iron complexes: long-lived NO that is trafficked by interacting proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, p.6960-6968, 2012.

RAJ, C.A.; RAGAVENDRAN, P.; SOPHIA, D.; STARLIN, T.; RATHI, M.A.; GOPALAKRISHNAN, V.K. Evaluation of In Vitro Enzymatic and Non-Enzymatic Antioxidant Properties of Leaf Extract from *Alpinia purpurata* (Vieill.) K. Schum. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 22, p. 691-695, 2016.

RAMANI, T.; AULETTA, C. S.; WEINSTOCK, D.; MOUNHO-ZAMORA, B.; RYAN, P. C.; SALCEDO, T. W.; BANNISH, G. Cytokines: The Good, the Bad, and the Deadly. **International Journal of Toxicology**, v. 34, p. 355–365, 2015

RAPHAEL, I., NALAWADE, S.; EAGAR, T.N.; FORSTHUBER, T.G. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. **Cytokine**, v. 74, p. 5-17, 2015, 2015.

REDPATH, S.A.; HEIEIS, G.A.; REYNOLDS, L.A.; FONSECA, N.M.; KIM, S.S.; PERONA-WRIGHT, G. Functional specialization of intestinal dendritic cell subsets during Th2 helminth infection in mice. **European Journal of Immunology**, v. 48, p. 87-98, 2018.

RICCI-AZEVEDO, R.; ROQUEBARREIRA, M.C.; GAY, N.J. Targeting and Recognition of Toll-Like Receptors by Plant and Pathogen Lectins. **Frontiers in Immunology**, v. 8, artigo 1820, 2017.

RIDNOUR, L.A.; THOMAS, D.D.; DONZELLI, S.; ESPEY, M.G.; ROBERTS, D.D.; WINK, D.A.; ISENBERG, J.S. The biphasic nature of nitric oxide responses in tumor biology. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, p. 1329-1337, 2006.

ROGERIO, A.P.; CARDOSO, C.R.; FONTANARI, C.; SOUZA, M.A.; AFONSO-CARDOSO, S.R.; SILVA, E.V.G.; KOYAMA, N.S.; BASEI, F.L.; SOARES, E.G.; STOWELL, J.B.C.S.R.; DIAS-BARUFFI, M.; FACCIOLI, L.H. Anti-asthmatic potential of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* Latex. **Glycobiology**, v. 17, p. 795–804, 2007.

ROSSI, A.P.; BUDUI, S.; ZOICO, E.; CALIARI, C.; MAZZALI, G.; FANTIN, F.; D'URBANO, M.; PAGANELLI, R.; ZAMBONI, M. Role of Anti-Inflammatory Cytokines on Muscle Mass and Performance Changes in Elderly Men and Women. **The Journal of Frailty & Aging**, v. 6, p. 65-71, 2017.

RUSSELL, J.H.; LEY, T.J. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 323–370, 2002.

SAIJO S, IKEDA S, YAMABE K.; KAKUTA, S.; ISHIGAME, H.; AKITSU, A.; FUJIKADO, N.; KUSAKA, T.; KUBO, S.; CHUNG, S.H.; KOMATSU, R.; MIURA, N.; ADACHI, Y.; OHNO, N.; SHIBUYA, K.; YAMAMOTO, N.; KAWAKAMI, K.; YAMASAKI, S.; SAITO, T.; AKIRA, S.; IWAKURA, Y. Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. **Immunity**, v. 32, p. 681–691, 2010.

SAKAGUCHI, S.; VIGNALI, D.A.A.; RUDENSKY, A.Y.; NIEC, R.E.; WALDMANN, H. The plasticity and stability of regulatory T cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, p. 461-467, 2013.

SALLUSTO, F.; CASSOTTA, A.; HOCES, D.; FOGlierini, M.; LANZAVECCHIA, A. Do Memory CD4 T Cells Keep Their Cell-Type Programming: Plasticity versus Fate Commitment? T-Cell Heterogeneity, Plasticity, and Selection in Humans. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, doi: 10.1101/cshperspect.a029421, 2017.

SANGWANANGKUL, P.; SARADHULDHAT, P.; PAULL, R.E. Survey of tropical cut flower and foliage responses to irradiation. **Postharvest Biology and Technology**, v. 48, p. 264-271, 2008.

SANTOS, A. F. S.; DA SILVA, M. D. C.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Lectins: Function, structure, biological properties and potential application. **Current Topics in Peptide and Protein Research**, v. 15, p. 41-62, 2014.

SANTOS, G.K.N.; DUTRA, K.A.; BARROS, R.A.; CÂMARA, C.A.G.; LIRA, D.D.; GUSMÃO, N.B.; NAVARRO, D.M.A.F. Essential oils from *Alpinia purpurata* (Zingiberaceae): Chemical composition, oviposition deterrence, larvicidal and antibacterial activity. **Industrial Crops and Products**, v. 40, p. 254-260, 2012.

SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 170–181, 2010.

SARTIM, M.A.; RIUL, T.B.; CISTIA-ANDRADE, C.D.; STOWELL, S.R.; ARTHUR, C.M.; SORGI, C.A.; FACCIOLI, L.H.; CUMMINGS, R.D.; DIAS-BARUFFI, M.; SAMPAIO, S.V. Galatrox is a C-type lectin in *Bothrops atrox* snake venom that selectively binds LacNAc-terminated glycans and can induce acute inflammation. **Glycobiology**, v. 24, p.1010–1021, 2014.

SARTIM, M.A.; SAMPAIO, S.V. Snake venom galactoside-binding lectins: a structural and functional overview. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 21, artigo 35, 2015

SATO, Y.; MORIMOTO, K.; KUBO, T.; SAKAGUCHI, T.; NISHIZONO, A.; HIRAYAMA, M.; HORI, K. Entry Inhibition of Influenza Viruses with High Mannose Binding Lectin ESA-2 from the Red Alga *Eucheuma serra* through the Recognition of Viral Hemagglutinin. **Marine Drugs**, v. 13, p. 3454-3465, 2015.

SCHMITT, E.; KLEIN, M.; BOPP, T. Th9 cells, new players in adaptive immunity. **Trends in Immunology**, v. 35, p. 61-68, 2014.

SHANMUGAVEL, S.; VELAYUTHAM, V.; KAMALANATHAN, T.; PERIASAMY, M.; MUNUSAMY, A.; SUNDARAM, J. Isolation and analysis of mannose/trehalose/maltose specific lectin from jack bean with antibruchid activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p.1-14, 2016.

SHARMA, P.; ALLISON, J.P. Immune Checkpoint Targeting in Cancer Therapy: Toward Combination Strategies with Curative Potential. **Cell**, v. 9, p. 205-214, 2015.

SHARON. Lectins: carbohydrate-specific reagents and biological recognition molecules. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 2753–2764, 2007.

SILVA, A.F.B.; MATOS, M.P.V.; RALPH, M.T.; SILVA, D.L.; ALENCAR, N.A.; M.V.; RAMOS, LIMA-FILHO, J.V. Comparison of immunomodulatory properties of mannose-binding lectins from *Canavalia brasiliensis* and *Cratylia argentea* in a mice model of *Salmonella* infection. **International Immunopharmacology**, v. 31, p.233-238, 2016.

SILVA, L.C.N.; ALVES, N.M.P.; CASTRO, M.C.A.B.; PEREIRA, V.R.A.; PAZ, N.V.N.; COELHO, L.C.B.B.; 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**, v. 72, p. 848-854, 2015.

SILVA, L.C.N.; CORREIA, M.T.S. Plant lectins and Toll-like receptors: implications for therapy of microbial infections. **Frontiers in Microbiology**, v.5, artigo 20, 2014.

SINGH, R.S.; KAUR, H.P.; SINGH, J. Purification and characterization of a mucin specific mycelial lectin from *Aspergillus gorakhpurensis*: application for mitogenic and antimicrobial activity. **PLoS One**, v. 9, artigo e109265, 2014.

SINGH, R.S.; KAUR, H.P.; SINGH, J. Purification and characterization of a mycelial mucin specific lectin from *Aspergillus panamensis* with potent mitogenic and antibacterial activity. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 2251-225, 2015.

SKON, C. N.; LEE, J. Y.; ANDERSON, K. G.; MASOPUST, D.; HOGQUIST, S. K. A. ; JAMESON, C. Transcriptional downregulation of S1pr1 is required for the establishment of resident memory CD8+ T cells. **Nature Immunology**, v. 14, p. 1285–1293, 2013.

SNELL, L.M.; OSOKINE, I.; YAMADA, D.H.; FUENTE, J.R.; ELSAESSER, H.J.; BROOKS, D.G. Overcoming CD4 Th1 Cell Fate Restrictions to Sustain Antiviral CD8 T Cells and Control Persistent Virus Infection. **Cell Reports**, v. 16, p. 3286-3296, 2016.

SOROOSH, P.; DOHERTY, T.A. Th9 and allergic disease. **Immunology**, v. 127, p. 450–458, 2009.

SOUZA, L.P.F.; RAMOS, E.L.P.; SANTANA, S.S.; SILVA, M.V.; SANTIAGO, F.M.; MINEO, T.W.P.; MINEO, J.R. Lectins from *Synadenium carinatum* (ScLL) and *Artocarpus heterophyllus* (ArtinM) Are Able to Induce Beneficial Immunomodulatory Effects in a Murine Model for Treatment of *Toxoplasma gondii* Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, artigo 164, 2016.

SOUZA, M.A.; CARVALHO, F.C.; RUAS, L.P.; RICCI-AZEVEDO, R.; ROQUE-BARREIRA, M.C. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. **Glycoconjugate Journal**, v. 30, p. 641–657, 2013.

SPITS, H.; ARTIS, D.; COLONNA, M.; DIEFENBACH, A.; SANTO, J.P.; EBERL, G.; KOYASU, S.; LOCKSLEY, R.M.; MCKENZIE, A.N.J.; MEBIUS, R.E.; POWRIE, F.; VIVIER, E. Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, p.145–149, 2013.

SPITS, H.; DI SANTO, J. P. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. **Nature Immunology**, v. 12, p. 21–27, 2011.

STAUDT, V.; BOTHUR, E.; KLEIN, M.; LINGNAU, K.; REUTER, S.; GREBE, N.; GERLITZKI, B.; HOFFMANN, M.; ULGES, A.; TAUBE, C.; DEHZAD, N.; BECKER, M.; STASSEN, M.; STEINBORN, A.; LOHOFF, M.; SCHILD, H.; SCHMITT, E.; BOPP, T. Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. **Immunity**, v. 33, p. 192–202, 2010.

STENKEN, J.A.; POSCHENRIEDER, A.J. Bioanalytical Chemistry of Cytokines- A Review,. **Analytica Chimica Acta**, v. 853, p.95-115, 2015.

SUBRAMANIAN, V. ; SUJA, S. Evaluation of antioxidant activity of *Alpinia purpurata* rhizome (Vieill). **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 601-607, 2011.

SUN, Y.; LI, LIU.; JUN, LI.; LI, SUN. Three novel b-type mannose-SPECIFIC lectins of *Cynoglossus semilaevis* possess varied antibacterial activities against Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 55, p.194-202, 2016.

SUNG,N.; BYUN, E.; SONG, D.; JIN, Y.; KIM, J.; PARK, J.; SONG, B.; JUNG, P.; BYUN, M.; LEE, J.; PARK, S.; KIM, J. Effect of gamma irradiation on mistletoe (*Viscum album*) lectin-mediated toxicity and immunomodulatory activity. **FEBS Open Bio**, v. 3, p.106-111, 2013.

TATSUTA, T.; SATOH, T.; SUGAWARA, S.; HARA, A.; HOSONO, M. Sialic acid-binding lectin from bullfrog eggs inhibits human malignant mesothelioma cell growth *in vitro* and *in vivo*. **PLoS ONE**, v. 13, artigo e0190653, 2018.

TEIXEIRA, C.R.; CAVASSANI, K.A.; GOMES, R.B.; TEIXEIRA, M.J.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; CAVADA, B.S.; DA SILVA, J.S.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. **Vaccine**, v. 24, p. 3001-3008, 2006.

TIAN, Z.; VELKINBURGH, J.C.V.; WU, Y.; NI, B. Innate lymphoid cells involve in tumorigenesis. **International Journal of Cancer**, v. 138, p. 22-29, 2016.

THOOPTIANRAT T.; CHAVEERACH, A.; SUDMOON, R.; TANEE, T.; LIEHR, T.; BABAYAN, N. Screening of phytochemicals and toxicity of medicinal plants, *Dillenia* species, reveals potential natural product resource. **Journal of Food Biochemistry**, v. 41, artigo e12363, 2017.

TOPPER, M. J.; VAZ, M.; CHIAPPINELLI, K.B.; SHIELDS, S.E.S.; NIKNAFS,N.; R.W.C.Y.A.A., WENZEL, HICKS, J.; BALLEW, M.; STONE, M.; TRAN, P.T.; ZAHNOW, C.A.; HELLMANN, M.D.; ANAGNOSTOU, V.; STRISSEL, P.L.; STRICK, R.; VELCULESCU, V.E.; BAYLIN, S.B. Epigenetic Therapy Ties MYC Depletion to Reversing Immune Evasion and Treating Lung Cancer. **Cell**, v. 171, p. 1284-1300, 2017.

TOSOLINI, M.; KIRILOVSKY, A.; MLECNIK, B.; FREDRIKSEN, T.; MAUGER, S.; BINDEA,G.; BERGER, A.; BRUNEVAL, P.; FRIDMAN, W.; PAGES, F.; GALON, J. Clinical Impact of Different Classes of Infiltrating T Cytotoxic and

Helper Cells (Th1, Th2, Treg, Th17) in Patients with Colorectal Cancer. **Cancer Research**, v. 71, p. 1263-1271, 2011.

VAN DAMME, E.J. History of plant lectin research. **Methods in Molecular Biology**, v. 1200, p. 3-13, 2014.

VAN DAMME, E.J.M.; LANNOO, N.; PEUMANS, W.J. Plant Lectins. **Advances in Botanical Research**, v. 48, p. 107–209, 2008.

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**, v. 17, p. 575–692, 1998.

VAN DAMME, E.J.M.; SMITH, D.F.; CUMMINGS, R.; PEUMANS, W.J. Glycan arrays to decipher the specificity of plant lectins. In: WU, A.M. (Ed.) **The molecular immunology of complex carbohydrates-3**. Springer, 2011, pp. 757-767.

VAN HOLLE, S.; VAN DAMME, E.L.S.J.M. Distribution and Evolution of the Lectin Family in Soybean (*Glycine max*). **Molecules**, v. 20, p.2868-2891, 2015.

VELDHOEN, M.; HOCKING, R.J.; ATKINS, C.J.; LOCKSLEY, R.M.; STOCKINGER, B. TGF- β in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. **Immunity**, v. 24, p. 179–189, 2006.

VELDHOEN, M.; UYTENHOVE, C.; VAN SNICK, J.; HELMBY, H.; WESTENDORF, A.; BUER, J.; MARTIN, B.; WILHELM, C.; STOCKINGER, B. Transforming growth factor- β “reprograms” the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. **Nature Immunology**, v. 9, p.1341–1346, 2008.

VILLAFLORES, O.B.; MACABEO, A.P.G.; GEHLE, D.; KROHN, K.; FRANZBLAU, S.G.; AGUINALDO, A.M. Phytoconstituents from *Alpinia purpurata* and their *in vitro* inhibitory activity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Pharmacognosy Magazine**, v. 6, p. 339–344, 2010.

VIVIER, E.; RAULET, D.H.; MORETTA, A.; CALIGIURI, M.A.; ZITVOGEL, L.; LANIER, L.L.; YOKOYAMA, W.M.; UGOLINI, S. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. **Science**, v. 331, p.44-49, 2011.

WALKER, J. A.; BARLOW, J. L.; MCKENZIE, A. N. Innate lymphoid cells— how did we miss them? **Nature Reviews Immunology**, v. 13, p. 75–87, 2013.

WANG, L.; WANG, A.L.; ZHANG, D.; LI, F.; WANG, M.; HUANG, M.; ZHANG, H.; SONG, L. A novel C-type lectin from crab *Eriocheir sinensis* functions as pattern recognition receptor enhancing cellular encapsulation. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 34, p. 832-842, 2013.

WANG, X.; ZHANG, Y.; YANG, X.O.; NURIEVA, R.I.; CHANG, S.H.; OJEDA, S.S.; KANG, H.S.; SCHLUNS, K.S.; GUI, J.; JETTEN, A.M.; DONG, C. Transcription of Il17 and Il17f is controlled by conserved noncoding sequence 2. **Immunity**, v.36, p. 23–31, 2012.

WEIGERT, A.; BRUNE, B. Nitric oxide, apoptosis and macrophage polarization during tumor progression. **Nitric Oxide**, v. 19, p. 95-102, 2008.

WESTERMEIER, R. Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations. 5^a. ed., Wiley-VCH, 2017.

WILHELM, C.; TURNER, J.E.; VAN, S.J.; STOCKINGER, B. The many lives of IL-9: a question of survival? **Nature Immunology**, v. 13, p. 637-641, 2012.

WYNN, T.A.; CHAWLA, A.; POLLARD, J.W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**, v. 496, p. 445-455, 2013.

WYNN, T.A. Type 2 cytokines: mechanisms and therapeutic strategies. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, p. 271-282, 2017.

YAMAGUCHI, T.; WING, J.B.; SAKAGUCHI, S. Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. **Seminars in Immunopathology**, v. 23, p. 424-430, 2011.

YANG XO, CHANG SH, PARK H, NURIEVA, R.; SHAH, B.; ACERO, L.; WANG, I.; SCHLUNS, K.S.; BROADDUS, R.R.; ZHU, Z.; DONG, C. Regulation of inflammatory responses by IL-17F. The **Journal of Experimental Medicine**, v. 205, p. 1063–1075, 2008.

YANG, N.; FENG, S.; SHEDDEN, K.; XIE, X.; LIU, Y.; ROSSER, C.J.; LUBMAN, D.M.; GOODISON, S. Urinary glycoprotein biomarker discovery for bladder cancer detection using LC/MS-MS and label-free quantification. **Clinical Cancer Research**, v. 17, p. 3349–3359, 2011.

YAN, J.; LIU, X.; XIAO, G.; LI, N.; DENG, Y.; HAN, L.; YIN, L.; LING, L.; LIU, L. Prevalence and Clinical Relevance of T-Helper Cells, Th17 and Th1, in Hepatitis B Virus-Related Hepatocellular Carcinoma. **PLoS One**, v. 9, artigo e96080, 2014.

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

YU, H.; ZHAO, T.; WU, H.; PAN, Y.; ZHANG, Z.; WANG, K.; ZHANG, C.; JIN, Y. Pinellia ternata lectin exerts a pro-inflammatory effect on macrophages by inducing the release of pro-inflammatory cytokines, the activation of the nuclear factor-κB signaling pathway and the overproduction of reactive oxygen species. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 36, p. 1127-1135, 2015.

ZUO, Z.; FAN, H.; WANG, X.; ZHOU, W.; LI, L. Purification and characterization of a novel plant lectin from *Pinellia ternata* with antineoplastic activity. **Springer Plus**, v. 1, artigo 13, 2012.

ZWIERZINA, H.; BERGMANN, L.; FIEBIG, H.; AAMDAL, S.; SCHOFFSKI, P.; WITTHOHN, K.; LENTZEN, H. The preclinical and clinical activity of aviscumine: a potential anticancer drug. **European Journal of Cancer**. v.47, p.1450–1457, 2011.

APÊNDICE A - ARTIGO

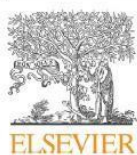
Lectin from inflorescences of ornamental crop *Alpinia purpurata* acts on immune cells to promote Th1 and Th17 responses, nitric oxide release, and lymphocyte activation

ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO

“Biomedicine & Pharmacotherapy”



Fator de impacto: 2.759



Available online at
ScienceDirect
 www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
 www.em-consulte.com/en



Lectin from inflorescences of ornamental crop *Alpinia purpurata* acts on immune cells to promote Th1 and Th17 responses, nitric oxide release, and lymphocyte activation



Jéssica de Santana Brito^a, Gustavo Ramos Salles Ferreira^a, Emeline Klimczak^b, Liliya Gryshuk^b, Nataly Diniz de Lima Santos^a, Leydianne Leite de Siqueira Patriota^a, Leyllane Rafael Moreira^c, Ana Karine Araújo Soares^c, Bruno Rafael Barboza^d, Patrícia Maria Guedes Paiva^a, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro^e, Virgínia Maria Barros de Lorena^c, Cristiane Moutinho Lagos de Melo^f, Marília Cavalcanti Coriolano^d, Thiago Henrique Napoleão^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Centro de Biotecnologias, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^b Département de Génie Biologique, Institut Universitaire de Technologie de Créteil-Vitry, Université Paris-Est Créteil Val-de-Marne, Vitry-sur-Seine, France

^c Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, Brazil

^d Faculdade Estácio do Recife, Estácio-FIR, Recife, Pernambuco, Brazil

^e Departamento de Química Fundamental, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

^f Departamento de Antibióticos, Centro de Biotecnologias, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 June 2017

Received in revised form 15 July 2017

Accepted 4 August 2017

Keywords:

Lymphocytes

Zingiberaceae

Cytokines

Thermostable protein

Bracts

ABSTRACT

Alpinia purpurata is an ornamental crop known as a source of bioactive molecules. This is the first study to report isolation of a lectin (carbohydrate-binding protein) from *A. purpurata* inflorescences (ApuL). The immunomodulatory potential of ApuL was evaluated by investigating its effects on the production of cytokines and release of nitric oxide by human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). In addition, the differentiation and activation of lymphocytes treated with ApuL was evaluated by immunophenotyping assays. ApuL is an acidic and oligomeric protein with native molecular mass of 34 kDa. The hemagglutinating activity (HA) of ApuL was inhibited by the glycoproteins fetuin and ovalbumin, was resistant to heating at 100 °C and stimulated in the presence of calcium and magnesium ions. ApuL showed highest HA at pH 7.5 but failed to agglutinate erythrocytes at pH 8.0 and 9.0. ApuL induced the release of cytokines belonging to Th1 (IFN- γ , TNF- α , and IL-6) and Th17 (IL-17A) profiles as well as of nitric oxide, stimulating a pro-inflammatory environment. Moreover, ApuL also stimulated the production of IL-10, an anti-inflammatory cytokine with regulatory role. Incubation with lectin resulted in differentiation and activation of both T CD8⁺ and CD4⁺ subsets of lymphocytes, as evident from the expression of the CD28 costimulatory molecule. In conclusion, *A. purpurata* inflorescence is a source of an immunomodulatory lectin with potential immunoregulatory application, thereby adding biotechnological value to this ornamental crop.

© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Plants have been used to treat diseases since antiquity and constitute one of the major sources of drugs used in traditional medicine. Plant-derived bioactive compounds serve as models for allopathic drugs [1–3]. Natural products have gained increasing

popularity in recent years, attracting attention of the population and scientific community [4].

The genus *Alpinia* (Zingiberaceae) contains many species that produce attractive inflorescences, increasing their use for ornamental purposes [5]. The plant *Alpinia purpurata* (Viell.) K. Schum. is native to the Pacific Islands and is a very popular garden plant in India and Brazil. It is cultivated in large scale for the production of cut flowers [6,7]. A part of the inflorescences is usually discarded without use due to quality standards [8]. Studies have investigated possible applications of these parts, leading to the demonstration

* Corresponding author.

E-mail address: thiago86@yahoo.com.br (T.H. Napoleão).

of the biotechnological relevance of the plant through its insecticidal, antimicrobial, and antioxidant activities [8–12].

Lectins are proteins with diverse molecular structures and biological properties [13]. These proteins have a characteristic ability to recognize carbohydrates, including simple and free sugars, polysaccharides, and oligosaccharide moieties present in glycoproteins and glycolipids [14]. Lectins detected and isolated from plant tissues have antiviral [15], insecticidal [16], antibacterial [17], antifungal [18], and anti-tumor activities [19]. In addition, some lectins are known to exert immunomodulatory effects [20–24].

Immunomodulatory agents have gained increasing importance, as induction or suppression of the immune system may be useful in treatment of cancer and infectious processes [25–27]. Moreover, changes in the cytokine production promoted by treatment with synthetic drugs or natural compounds are essential for the activation and recruitment of the immune response [28].

The immunomodulatory activity of plant lectins is known to be initiated by their interaction with glycan moieties present on the surface of immune cells. The binding between lectin and cell carbohydrates may trigger biological responses of initiation, amplification, or inhibition of transmembrane signal transduction pathways. This may result in cell proliferation, differentiation, migration, and activation of cell death [29,30]. In addition, the interaction between lectin and immune cells may lead to the production of certain cytokines, thereby promoting efficient immune responses against microbial infections or tumor cells [31].

In this paper, we evaluated *A. purpurata* inflorescence as a potential source of lectins – a well-recognized class of biotechnologically relevant proteins. The isolated lectin ApuL was investigated for its cytotoxic effect against human lymphocytes as well as its immunomodulatory properties on human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The description of novel bioactive compounds from cultivated ornamental plants will add new value to the production chain and suggest potential uses for discarded materials.

2. Material and methods

2.1. Lectin isolation

Inflorescences of *A. purpurata* were collected at the campus of the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), with authorization (number 36301) of the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) from Brazilian Ministry of Environment. The bracts were separated, washed with distilled water, and dried at 28 °C for 2 days. The dried material was milled and the resulting powder (10 g) suspended in 0.15 M sodium chloride (NaCl, 100 mL) for 16 h at 28 °C under constant stirring. The suspension was passed through filter paper and gauze and the filtrate centrifuged (10 min, 3000g) to yield an extract. Ammonium sulfate (40% saturation) was added to the extract for precipitation of proteins [32]. After stirring for 4 h at 28 °C, the solution was centrifuged (10 min, 3600 rpm) and the precipitated fraction (PF) and supernatant fraction (SF) were dialyzed (6 h, two liquid changes) against distilled water using a 10-kDa cut-off cellulose membrane (Sigma-Aldrich, USA). The dialyzed SF (2 mL; 2.5 mg protein) was subjected to gel-filtration chromatography on a Sephadex G-75 (GE Healthcare Life Sciences, Sweden) column (30.0 × 1.5 cm) previously equilibrated with 0.15 M NaCl. The column was irrigated with 0.15 M NaCl at a flow rate of 20 mL/h. Fractions of 5 mL were collected and monitored for absorbance at 280 nm wavelength and hemagglutinating activity as described in the next section. The first peak was deemed ApuL (*A. purpurata* inflorescence lectin) as explained under 'Results and discussion'. In all purification steps, the protein

concentration was determined according to the method described by Lowry et al. [33].

2.2. Hemagglutinating activity

Hemagglutinating activity (HA) of the extract, PF, SF, and chromatographic fractions was evaluated as described by Procópio et al. [18] using rabbit erythrocytes fixed with glutaraldehyde [34]. The assay was performed in 96-well V-bottomed microplates treated with 50 µL of 0.15 M NaCl. In a row, the first well corresponded to the control. A 50 µL volume of the sample was added to the second well and starting from this well, a two-fold serial dilution was performed until the end of the row. Finally, 50 µL of the erythrocyte suspension (2.5% v/v) in 0.15 M NaCl was added to all wells. After 45 min of incubation at 28 °C, the occurrence of erythrocyte agglutination was observed. The number of HA units was recorded as the inverse of the highest dilution at which the sample was still capable of undergoing erythrocyte agglutination. Specific HA (SHA) was calculated as the ratio of HA and protein concentration (mg/mL). The Ethics Committee on Animal Experimentation of the Universidade Federal de Pernambuco approved the method used to collect erythrocytes (process 23076.033782/2015-70).

2.3. Determination of native molecular mass

Native molecular mass of ApuL was determined by loading the lectin (2 mL; 2 mg of protein) onto a HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 HR column coupled to the ÄKTAprius plus system (GE Healthcare Life Sciences, Sweden). Chromatographic separation was performed using 0.15 M NaCl at a flow rate of 0.5 mL/min. Fractions collected (2.0 mL) were monitored for absorbance at 280 nm wavelength. A mixture of bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), and lysozyme (14 kDa), all purchased from Sigma-Aldrich (USA), was chromatographed under same conditions. The relative molecular mass of ApuL was calculated by comparing its migration with the migration of these marker proteins.

2.4. Polyacrylamide gel electrophoresis

The homogeneity of ApuL was evaluated by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) for native basic (12%, w/v, gel) or acidic (10%, w/v, gel) proteins [35,36]. The subunit composition of ApuL was determined through PAGE (15%, w/v, gel) in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS) according to method of Laemmli [37]. Polypeptide bands from the sample and molecular mass markers (12–225 kDa; GE Healthcare Life Sciences, Sweden) were stained with silver nitrate (Silver BULLit™, Amresco).

2.5. Evaluation of carbohydrate specificity

The HA inhibition assay was used to evaluate the ApuL carbohydrate-binding specificity. The assay was similar to the HA assay except for the use of carbohydrate solution in place of 0.15 M NaCl for serial dilution. In addition, an incubation step of 15 min at 28 °C was included before the addition of erythrocytes. The effects of monosaccharides (200 mM) glucose, galactose, *N*-acetylglucosamine, ribose, methyl- α -glucopyranoside, and mannose as well as the glycoproteins (0.5 mg/mL) fetuin and ovalbumin were evaluated.

2.6. Effects of temperature, pH, and ions on hemagglutinating activity

The effect of temperature on HA of ApuL was evaluated by incubating the lectin at different temperatures (40–100 °C) for

20 min before performing the HA assay. To evaluate the effect of pH, HA assay was performed with the replacement of 0.15 M NaCl with different buffers (0.1 M citrate phosphate buffer [pH 5.0 and 6.0], 0.1 M sodium phosphate buffer [pH 7.0 and 7.5], or 0.1 M Tris-HCl [pH 8.0 and 9.0]). In addition, an incubation step (30 min, 28 °C) was included before the addition of erythrocytes. To evaluate the effect of divalent cations on HA, 0.15 M NaCl used in the HA assay was replaced with 0.2 M calcium chloride (CaCl₂) or 0.2 M magnesium chloride (MgCl₂).

To evaluate the dependence of ApuL HA on divalent cations, the lectin was incubated (45 min, 28 °C) with 5 mM ethylenediamine tetracetic acid (EDTA), followed by dialysis with 0.15 M NaCl (6 h, 4 °C) to separate EDTA. Next, the hemagglutinating assay was performed in the absence of cations.

2.7. Isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

Blood (40 mL) was collected from six voluntary donors in heparin tubes (Vacuette) after obtaining a "term of free and informed consent" from all donors. The Ethics Committee from the Universidade Federal de Pernambuco approved (number 1.870.360/2016) the experimental protocols. PBMCs were obtained through a gradient concentration technique. After the addition of Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare Life Sciences, Sweden) and centrifugation (400g, 30 min, 20 °C), the ring of PBMCs was collected, washed twice with sterile phosphate-buffered saline (PBS) and counted using a Neubauer chamber. Cell viability was assessed by the trypan blue dye exclusion method (Sigma-Aldrich, USA). Cells were used for the assays only if the viability was >98%. PBMCs were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Sigma-Aldrich, USA) supplemented with 10% (w/v) fetal bovine serum (Sigma-Aldrich, USA) in 24-well plates (TPP Techno Plastic Products, Switzerland) at a density of 10⁶ cells/well.

2.8. Evaluation of cytotoxicity of ApuL against lymphocytes

Lymphocytes from PBMCs (10⁶ cells/well) were cultured in RPMI medium for 24 h in the absence and presence of ApuL (6.25, 12.5, 25.0, and 50.0 µg/mL). Cells were centrifuged at 450 × g for 10 min at 4 °C. The supernatant was discarded and the pellet resuspended in 1 mL of 1 × PBS. Cells were re-centrifuged at previous conditions. The pellet obtained was resuspended in 300 µL binding buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, and 1.8 mM CaCl₂) and transferred to a labeled cytometer tube. Annexin V conjugated with fluorescein isothiocyanate (AnnV-FITC) (1:500) and propidium iodide (PI, 20 µg/mL) were added. Flow cytometry was performed in a FACSCalibur platform (BD Biosciences, San Jose, USA) and the results were analyzed using CellQuest Pro software (BD Biosciences). AnnV+/PI+ cells were considered as necrotic and AnnV+/PI− cells were considered in their early stage of apoptosis. Double negative cells were considered as viable.

2.9. Measurement of cytokines levels and nitrite analysis

PBMCs (10⁶ cells/well) were cultured in the absence and presence of ApuL (12.5 µg/mL) in RPMI medium for 24 h. Supernatants of cultures were collected for the quantification of cytokines using the cytometric bead array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (Becton Dickinson Biosciences, USA) for simultaneous detection of interleukins (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A), tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), and interferon-gamma (IFN-γ). Assays were performed according to the manufacturer's instructions and data acquired on FACSCalibur platform. Six individual cytokine standard curves (0–5000 pg/mL) were run in each assay.

Supernatants from cultures were also used for nitrite analysis by the colorimetric Griess method [38]. Readings were carried out in a microplate spectrophotometer (Thermo Scientific Multiskan FC, Waltham-USA) at 595 nm wavelength. Nitric oxide (NO) concentration was estimated using a standard curve (3.125–100 µmol/mL).

2.10. Lymphocytes immunophenotyping assay

We cultured PBMCs (10⁶ cells/well) for 24 h in RPMI medium in presence and absence of ApuL (12.5 µg/mL). Following incubation, cells were removed from the plate using ice-cold 1% PBS-Wash (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM disodium phosphate [Na₂HPO₄], and 1.8 mM monopotassium phosphate [KH₂PO₄]; BD Biosciences) and transferred to 15-mL polypropylene tubes containing 6 mL of PBS-Wash for centrifugation (400 × g for 10 min). The supernatant was discarded and cell pellet washed with 2 mL PBS-Wash, followed by centrifugation at 400 × g for 5 min. The supernatant was discarded and the cells were treated with surface monoclonal antibodies conjugated with peridinin chlorophyll (PerCP), FITC, phycoerythrin (PE), or allophycocyanin (APC) (anti-CD4-PerCP, anti-CD8-FITC, anti-CD28-PE, and anti-CTLA-4-APC, respectively; BD Biosciences) for 30 min. Following incubation, cells were washed twice with 1 mL PBS-Wash, followed by centrifugation at 400 × g for 5 min. Cells were fixed for 15 min with 150 mL Cytotfix solution (BD Biosciences), washed with 2 mL PBS-Wash, and centrifuged at 400 × g for 5 min. After removal of the supernatant, 300 µL PBS-Wash was added to each tube and the solution loaded onto the FACSCalibur platform.

2.11. Statistical analysis

Data were analyzed using non-parametric tests. Standard deviations (SD) were calculated using the software GraphPad Prism 5.0 and data expressed as a mean of replicates ± SD. Student's *t*-test was used to analyze the results from cell viability assay, while differences between treatment groups were analyzed by Wilcoxon test. A value of *p* < 0.05 was considered as statistically significant.

3. Results

The saline extract from *A. purpurata* inflorescence showed HA (Table 1), suggestive of the presence of lectins. The PF and SF obtained after ammonium sulfate treatment and dialysis were also able to agglutinate erythrocytes (Table 1). However, SF showed higher SHA and hence was chosen for the purification process.

Chromatographic separation of SF on Sephadex G-75 (Fig. 1A) yielded a major protein peak (PI) that showed SHA of 182.8 and another peak (PII) without HA. PAGE for native acidic proteins revealed a single polypeptide band for PI (Fig. 1A, inset); no band was detected in PAGE for basic proteins. The corresponding peak was deemed ApuL (*A. purpurata* lectin) and showed a purification

Table 1
Purification of lectin (ApuL) from *Alpinia purpurata* inflorescence.

Sample	Protein (mg/mL)	Hemagglutinating activity (HA)		
		Units	SHA	Purification factor
Extract	7.9	128	16.2	1.0
PF	2.32	4	1.72	0.11
SF	1.5	32	21.33	1.31
PI (ApuL)	1.4	256	182.8	11.2

Specific HA (SHA) corresponds to the ratio between the number of units and protein concentration (mg/mL). Purification factor was calculated by the ratio between the SHA in the stage and the specific activity of the extract.

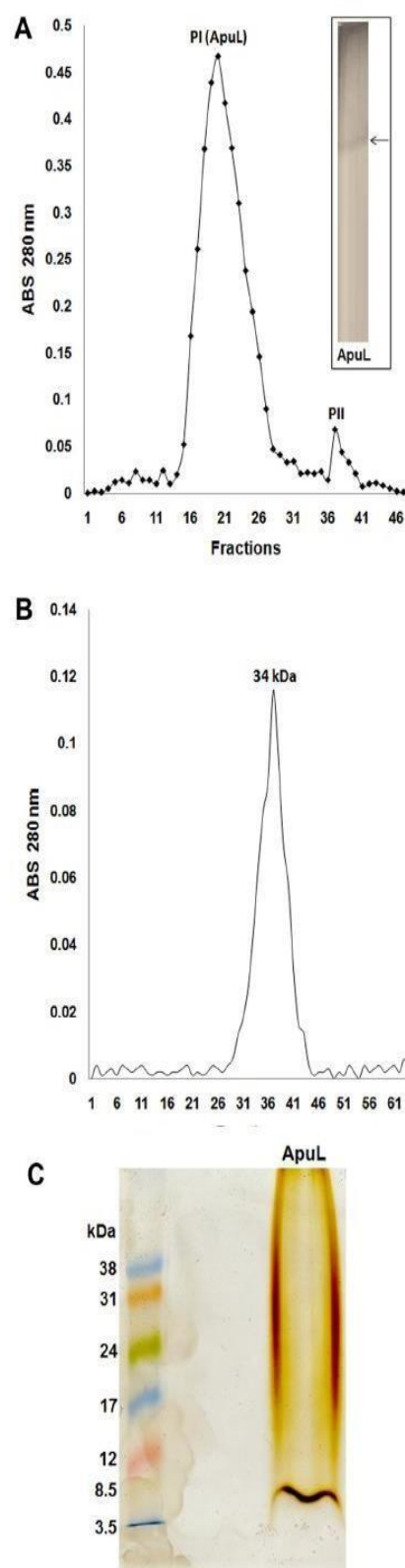


Fig. 1. Purification of lectin from *Alpinia purpurata* inflorescence (ApuL). (A) Chromatographic separation of inflorescence extract on Sephadex G-75 column using 0.15 M NaCl (flow rate: 20 mL/h) as the mobile phase. Fractions of 2.0 mL were collected and evaluated for absorbance at 280 nm wavelength (ABS 280 nm). The inset shows the PAGE for native acidic proteins of PI stained with silver nitrate. (B) Gel-filtration chromatography of ApuL (1.0 mg protein) on a HiPrep 16/60 Sephacryl S-100HR column coupled to the ÄKTAprime plus system. (C) Electrophoresis of ApuL and molecular mass markers under denaturing conditions (SDS-PAGE). The gel was stained with silver nitrate.

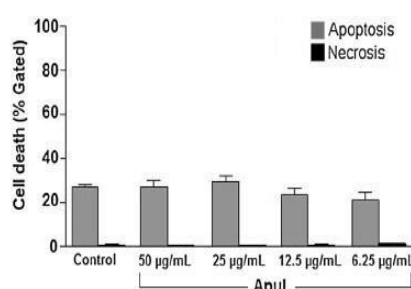


Fig. 2. Investigation of the cytotoxic effect of ApuL (6.25–50 µg/mL) on human lymphocytes by flow cytometry using the markers annexin V (AnnV) and propidium iodide (PI). AnnV+/PI+ cells were considered necrotic and AnnV+/PI− cells were considered apoptotic. ApuL failed to show any significant induction of cell death when compared with control (cells in RPMI medium). Vertical bars represent the average of six independent experiments performed in triplicates.

factor of 11.2 (Table 1). The native molecular mass of ApuL was approximately 34 kDa, as estimated by gel-filtration chromatography (Fig. 1B). ApuL presented a single polypeptide band with apparent molecular mass of 7.4 kDa in SDS-PAGE (Fig. 1C). These data indicate that ApuL is an oligomeric protein.

The SHA of ApuL decreased from 182.8 to 45.71 and 2.85 upon incubation with fetuin and ovalbumin, respectively. On the other hand, incubation with test monosaccharides failed to alter the ability of ApuL to agglutinate erythrocytes.

Evaluation of thermostability revealed that ApuL showed no alteration in its HA after heating at all temperatures. Highest HA for ApuL was detected upon incubation at pH 7.5 (SHA 182.8). The lectin was also active at pH 5.0 and 6.0 (SHA of 11.42). On the other hand, ApuL failed to agglutinate erythrocytes when incubated at pH 8.0 and 9.0. The SHA of ApuL increased to 731.4 and 365.7 in the presence of Ca^{2+} and Mg^{2+} , respectively. ApuL did not show loss in its hemagglutinating activity after treatment with the chelating agent EDTA.

Cytotoxicity of ApuL against lymphocytes was evaluated and, after 24 h of incubation, there were no differences between the

number of necrotic and apoptotic cells in control and lectin-treated groups (Fig. 2). The lectin ApuL induced PBMCs to release the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-17A, the pleiotropic cytokine IL-6, and the anti-inflammatory cytokine IL-10 (Fig. 3A–D). In addition, the release of IFN- γ and NO was stimulated (Fig. 3E–F).

Lymphocyte immunophenotyping assay showed ApuL (12.5 µg/mL) to stimulate the differentiation of both $\text{CD}8^+$ and $\text{CD}4^+$ subsets of T lymphocytes as compared to control (Fig. 4). ApuL also stimulated the activation of T $\text{CD}4^+$ and T $\text{CD}8^+$, as evident from the increase in the number of cells expressing the protein CD28 (Fig. 5). No difference regarding the CTLA-4 co-stimulatory molecule was recorded between cells treated with ApuL and control for $\text{CD}8^+$ (% of gate, 3.45 ± 0.77 versus 2.46 ± 0.61 to control and ApuL, respectively) and $\text{CD}4^+$ (% of gate, 1.2 ± 0.12 versus 1.36 ± 0.21 to control and ApuL, respectively) lymphocytes.

4. Discussion

Alpinia plants are not only known for their ornamental value but also for their bioactivities. The genus is referred as a “gold mine of future therapeutics” by Ghosh and Rangan [5]. In this work, we reported the isolation of a lectin with immunomodulatory effects from *A. purpurata* inflorescences, expanding its potential biotechnological applications.

ApuL showed to be an acidic and oligomeric protein with higher ability to bind glycoconjugates than simple sugars. Other lectins also showed specificity for oligosaccharides present in glycoproteins [16,18,24]. ApuL is also a protein resistant to heating, which is not uncommon among plant lectins. A lectin from *Phaseolus vulgaris* cv. (Anasazi beans) was stable upon heating at 90 °C [39], and a lectin from *Chenopodium quinoa* seeds (CqLec) was stable up to a temperature of 70 °C [40]. Other examples include the lectins from *Myracrodruon urundeuva* leaf, bark, and heartwood (MuLL, MuBL, and MuHL), which lost their ability to agglutinate erythrocytes only when heated at 100 °C [16], and the water-soluble *Moringa oleifera* seed lectin (WSMoL), with HA affected when heated at 100 °C for 5 h plus an overnight incubation at 37 °C [41]. In addition, the lectin from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae (CasuL) retained the ability to agglutinate erythrocytes even after heating in boiling water [18], as observed for ApuL.

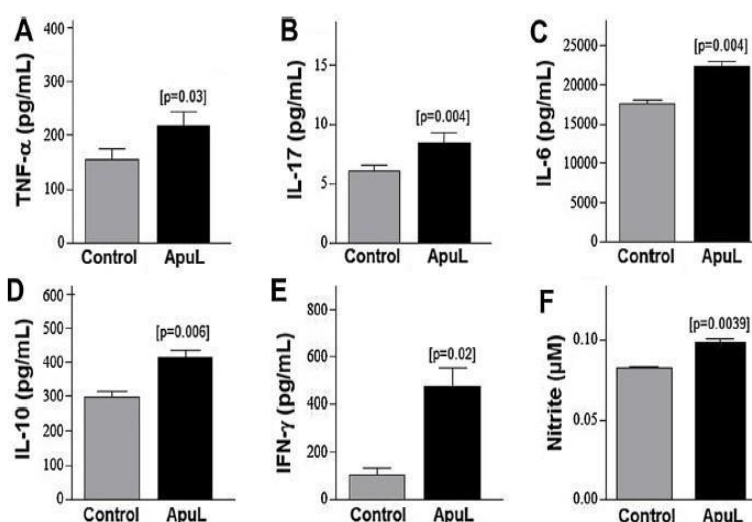


Fig. 3. Immunomodulatory effects of ApuL (12.5 µg/mL) on human PBMCs. (A–E) ApuL promoted higher (as indicated by the p-values) release of TNF- α (A), IL-17 (B), IL-6 (C), IL-10 (D), and IFN- γ (E) in comparison with control (cells in RPMI medium) in the 24-h assay. Nitric oxide (F) production was stimulated by ApuL as compared to the control. Bars represent the average of independent experiments performed in triplicates for each of the six individuals (blood donors).

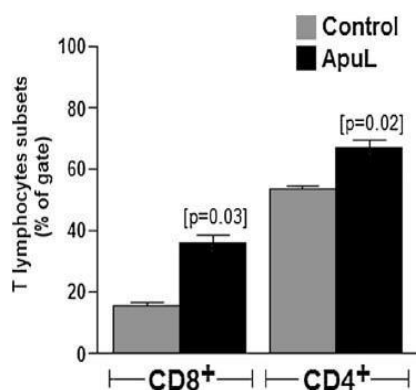


Fig. 4. ApuL (12.5 μ g/mL) stimulated the differentiation of T CD8⁺ (A) and T CD4⁺ (B) subsets as compared with the control, as indicated by the p-values. Control represents cells cultured only with RPMI medium. The bars represent the average of independent experiments performed in triplicates for each of the six individuals (blood donors).

The presence of cations such as calcium may affect the overall conformation of the protein, thereby altering its activity. Santana et al. [42] reported that the stimulatory effect of Ca^{2+} and Mg^{2+} on HA of a *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin (MvRL) was associated with changes in the protein surface charge. In the present work, we found that the presence of calcium ions stimulated the ApuL HA but this lectin is not a cation-dependent

lectin unlike the lectin derived from *Platypodium elegans* seeds, which requires Ca^{2+} and Mn^{2+} for its activity [43].

ApuL was used in the immunomodulatory assays at 12.5 μ g/mL concentration based on pilot assays (data not shown). In summary, the results suggest that ApuL did not act specifically but rather as a polyclonal activator, because the levels of IL-6, IL-17A, IFN- γ , TNF- α , and of suppressor cytokine, IL-10, have been increased. IFN- γ , mainly produced by T CD4⁺ lymphocytes and natural killer (NK) cells, is the main Th1 cytokine responsible for macrophage activation and differentiation as well as for the induction of the expression of pro-inflammatory proteins such as the inducible NO synthase [44,45]. Other lectins such as ConBr (from *Canavalia brasiliensis* seeds), CFL (from *Cratylia argentea* seeds), and MvFL (from *Microgramma vacciniifolia* fronds) induced PBMCs to release IFN- γ and NO [20,24], while Cramoll (from *Cratylia mollis* seeds) stimulated the release of IFN- γ by peritoneal exudate cells [46] and mice splenocytes [47].

Aside from IFN- γ , the induction of Th1 response by ApuL was reinforced by the stimulation of TNF- α , IL-6, and NO production. TNF- α has an essential role in immunoregulatory response of the activated macrophages, inducing the release of NO and prostaglandins. IL-6 is a pleiotropic cytokine, which may be produced by lymphocytes, macrophages, dendritic cells, and other cells. It functions in cell proliferation, survival, differentiation, migration, inflammation, and metabolism. Studies show that IL-6 plays key role in autoimmune and chronic inflammatory diseases [48,49]. However, IL-6 may coordinate pro-inflammatory or anti-inflammatory responses based on the environmental conditions [50]. Moreover, the role of IL-6 is important in the differentiation of Th17

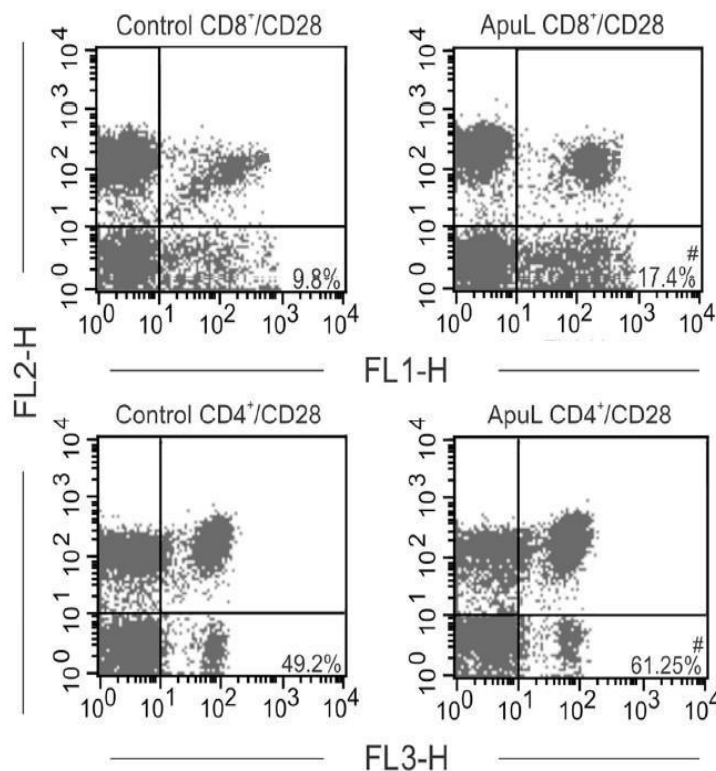


Fig. 5. Dot plot of T-lymphocyte activation promoted by ApuL (12.5 μ g/mL) upon incubation with human PBMC for 24 h. ApuL stimulated the activation (expression of CD28 costimulatory molecule) of both TCD4⁺ ($p=0.02$) and TCD8⁺ ($p=0.01$) subsets as compared with the control (cells in RPMI medium). Dot plots represent the average of six independent experiments performed in triplicates.

cells [51]. NO is a cytotoxic effector molecule active against microorganisms, parasites, and tumor cells and exerts an important function in immune system modulation [52].

IL-17A is a pro-inflammatory molecule mostly released by Th17 cells, but may also be produced by NK cells, macrophages, and other activated cells of the immune system [53–55]. It plays an important role in conferring immunity against extracellular pathogens [56,57], has been associated with inflammatory and autoimmune diseases [58], and is involved with the recruitment, activation, and migration of neutrophils [59]. In line with our findings, lectins such as ConA, E-PHA (*Phaseolus vulgaris* lectin), L-PHA (phytohemagglutinin-L from *Phaseolus vulgaris*), SNA (*Sambucus nigra* lectin from Elderberry bark), MAL (*Maackia amurensis* lectin I), UEA (*Ulex europaeus* isoagglutinin I), and Jacalin (*Artocarpus integrifolia* lectin) are known to induce IL-17 production by immune cells [60]. On the other hand, the lectin MvFL was unable to stimulate Th17 response by human PBMCs [24].

Lexberg et al. [61] demonstrated the molecular mechanism involved in the generation of an additive phenotype (Th1 and Th17) called as the “Th1/Th17” cells. This distinct Th cell population is characterized by the coexpression of cytokines IFN- γ and IL-17 [59,62]. It has been suggested that Th1/Th17 cells expressing IFN- γ have pro-inflammatory properties clearly distinct from those of Th1 or Th17 cells [61,63]. It is possible that ApuL stimulated the Th1/Th17 phenotype, resulting in the production of TNF- α , IL-6, IL-17, and IFN- γ .

The cytokine IL-10 is produced by many cell types (Th1, Th2, Th17, and regulatory T [Treg] cells) and acts in immune regulation by influencing antigen presentation, T-cell differentiation, cytokine production, and inflammation intensity [64–66]. Edwards et al. [67] showed that IL-10 controls the deleterious action of Th17 cells in autoimmune disease. ApuL was able to induce the production of pro-inflammatory cytokines with a concurrent production of IL-10. This is important for regulation of exacerbated inflammatory response. Similar results were observed with the lectin MvFL [24].

ApuL stimulated the differentiation and activation of T CD8⁺ and CD4⁺ lymphocytes. Activation of T lymphocytes leads to its proliferation, which is regulated by distinct signals [68] such as the T-cell receptor (TCR) activation, which generates specific antigen response, and the action of the costimulatory molecule [69,70]. The activation of T CD4⁺ and T CD8⁺, was evident by the increase in the number of cells expressing the protein CD28, a costimulatory activation molecule for CD80 and CD86 ligands on antigen-presenting cells (APCs). The molecule CTLA-4 inhibits cellular function and is usually expressed on the cell surface shortly after activation [71,72]. The inhibitory effect was evaluated by investigating the CTLA-4 co-stimulatory molecule, but the results showed that the lymphocytes activated by ApuL lack the expression of CTLA-4 after 24-h incubation. It is important to emphasize that ApuL must be activating other types of immune cells and not only T cells, as evidenced by the production of a cocktail of cytokines.

Plant lectins have immunomodulatory action, highlighting their ability to positively modify the immune response under certain pathological conditions such as cancer and infections. The proinflammatory activity of ApuL regulated by IL-10 shows its potential application as an immunomodulatory agent.

5. Conclusion

Alpinia purpurata inflorescences are the source of a thermostable lectin with immunomodulatory effects on human cells. ApuL induced Th1 and Th17 responses with concurrent regulation by IL-10 and activated T CD8⁺ and CD4⁺ lymphocytes. Our study results add biotechnological value to this ornamental crop.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq; 446902/2014-4) for research grants and fellowships (PMGP, DMAFN and THN) and the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES; AUXPE 1454/2013) and the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE; APQ-0108-2.08/14; APQ-0661-2.08/15, APQ-1703-2.11/15) for financial support. JSB would like to thank CAPES for the graduate scholarship. The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health (PDTIS) of the *Fundação Oswaldo Cruz* for use of its facilities. The authors would also like to thank Mr. Mineo Nakazawa from the Immunoparasitology Laboratory of the *Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz* for his technical assistance.

References

- [1] S. Shyamal, P.G. Latha, S.R. Sujá, V.J. Shine, G.I. Anuja, S. Sini, Hepatoprotective effect of three herbal extracts on aflatoxin B1-intoxicated rat liver, *Singapore Med. J.* 4 (2010) 326–331.
- [2] E. Madrigal-Santillán, E. Madrigal-Bujaidar, I. Álvarez-González, M.T. Sumaya-Martínez, J. Gutiérrez-Salinas, M. Bautista, A. Morales-González, M.G.-L. González-Rubio, J.L. Aguilar-Faisal, Review of natural products with hepatoprotective effect, *World J. Gastroenterol.* 20 (2014) 14787–14804.
- [3] F. Akram, M.T. Salman, D.G. Krishnan, N. Ahmad, A. Khan, Herbal drugs: knowledge, attitude and practice of its concurrent use with allopathic drugs, scientific testing and effectiveness in common diseases among educated class, *Int. J. Basic Clin. Pharmacol.* 5 (2016) 1275–1280.
- [4] D.A. Dias, S. Urban, U. Roessner, A historical overview of natural products in drug discovery, *Metabolites* 2 (2012) 303–336.
- [5] S. Ghosh, L. Rangan, *Alpinia*: the gold mine of future therapeutics, *Biotech* 3 (2013) 173–185.
- [6] M. Sabu, Zingiberaceae and Costaceae of South India, *Indian Association for Angiosperm Taxonomy*, Calicut University, India, 2006, pp. 68–70.
- [7] A.R.M. Gomes, R.S. Gondim, F.C. Bezerra, C.A.G. Costa, Evapotranspiração e coeficientes de cultivo da *Alpinia purpurata*, *Rev. Ciênc. Agron.* 39 (2008) 481–486.
- [8] G.K.N. Santos, K.A. Dutra, R.A. Barros, C.A.G. Câmara, D.D. Lira, N.B. Gusmão, D. M.A.F. Navarro, Essential oils from *Alpinia purpurata* (Zingiberaceae): Chemical composition, oviposition deterrence, larvicidal and antibacterial activity, *Ind. Crops Prod.* 40 (2012) 254–260.
- [9] C.S. Lira, E.V. Pontual, L.P. Albuquerque, L.M. Paiva, P.M.G. Paiva, J.V. Oliveira, T. H. Napoleão, Evaluation of the toxicity of essential oil from *Alpinia purpurata* inflorescences to *Sitophilus zeamais* (maize weevil), *Crop Prot.* 71 (2015) 95–100.
- [10] K.P. Kochuthressi, B.S. John, M.L. Joel, M.O. Jaseentha, S.R. Senthilkumar, Efficient regeneration of *Alpinia purpurata* (Vieill.) K. Schum. plantlets from rhizome bud explants, *Int. Res. J. Plant Sci.* 1 (2010) 43–47.
- [11] P.S. Vankar, V. Tiwari, L.W. Singh, N. Swapana, Antioxidant properties of some exclusive species of Zingiberaceae family of Manipur, *J. Environ. Agric. Food Chem.* 5 (2006) 1318–1322.
- [12] C.A. Raj, P. Ragavendran, D. Sophia, T. Starlin, M.A. Rathi, V.K. Gopalakrishnan, Evaluation of in vitro enzymatic and non-enzymatic antioxidant properties of leaf extract from *Alpinia Purpurata* (Vieill.) K. Schum, *Chinese J. Integr. Med.* 22 (2016) 691–695.
- [13] A.F.S. Santos, M.D.C. Silva, T.H. Napoleão, P.M.G. Paiva, M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, Lectins: function, structure, biological properties and potential applications, *Curr. Top. Peptide Protein Res.* 15 (2014) 41–62.
- [14] L.C.B.B. Coelho, P.M.S. Silva, V.L.M. Lima, E.V. Pontual, P.M.G. Paiva, T.H. Napoleão, M.T.S. Correia, Lectins, interconnecting proteins with biotechnological/pharmacological and therapeutic applications, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2017 (2017) 1594074.
- [15] J.T.S. Hopper, S. Ambrose, O.C. Grant, S.A. Krumm, T.M. Allison, M.T. Degiacomi, M.D. Tully, L.K. Pritchard, G. Ozorowski, A.B. Ward, M. Crispin, K.J. Doores, R.J. Woods, J.L.P. Benesch, C.V. Robinson, W.B. Struwe, The tetrameric plant lectin BanLec neutralizes HIV through bidentate binding to specific viral glycans, *Structure* 25 (2015) 1–10.
- [16] T.H. Napoleão, F.S. Gomes, T.A. Lima, N.D.L. Santos, R.A. Sá, A.C. Albuquerque, L. C.B.B. Coelho, P.M.G. Paiva, Termiticidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* against *Nasutitermes corniger* and its mechanisms, *Int. Biodeter. Biodegr.* 65 (2011) 52–59.
- [17] M.C. Moura, T.H. Napoleão, M.C. Coriolano, P.M.G. Paiva, R.C.B.Q. Figueiredo, L. C.B.B. Coelho, Water-soluble *Moringa oleifera* lectin interferes with growth, survival and cell permeability of corrosive and pathogenic bacteria, *J. Appl. Microbiol.* 119 (2015) 666–676.
- [18] T.F. Procópio, L.L.S. Patriota, M.C. Moura, P.M. Silva, A.P.S. Oliveira, L.V.N. Carvalho, T.A. Lima, T. Soares, T.D. Silva, L.C.B.B. Coelho, M.G.R. Pitta, M.J.B.R. Rêgo, R.C.B.Q. Figueiredo, P.M.G. Paiva, T.H. Napoleão, Casul: A new lectin

- isolated from *Calliandra surinamensis* leaf pinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect, *Int. J. Biol. Macromol.* 98 (2017) 419–429.
- [19] M. Pervin, Y. Koyama, M. Isemura, Y. Nakamura, Plant lectins in therapeutic and diagnostic cancer research, *Int. J. Plant Biol. Res.* 3 (2015) 1030.
 - [20] J.E.C. Batista, M.T. Ralph, R.V. Vaz, P.F.C. Souza, A.B. Silva, D.C.O. Nascimento, L.T. Souza, M.V. Ramos, P. Mastroeni, J.V. Lima-Filho, Plant lectins ConBr and CFL modulate expression toll-like receptors, pro-inflammatory cytokines and reduce the bacterial burden in macrophages infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Phytomedicine* 25 (2017) 52–60.
 - [21] V.P. Kumar, Y.P. Venkatesh, Alleviation of cyclophosphamide-induced immunosuppression in Wistar rats by onion lectin (*Allium cepa* agglutinin), *J. Ethnopharmacol.* 186 (2016) 280–288.
 - [22] L.C.N. Silva, N.M.P. Alves, M.C.A.B. Castro, V.R.A. Pereira, N.V.N. Paz, L.C.B.B. Coelho, R.C.B.Q. Figueiredo, M.T.S. Correia, Immunomodulatory effects of pCramoll and rCramoll on peritoneal exudate cells (PECs) infected and non-infected with *Staphylococcus aureus*, *Int. J. Biol. Macromol.* 72 (2015) 848–854.
 - [23] T. Hajto, A. Horváth, S. Papp, Improvement of quality of life in tumor patients after an immunomodulatory treatment with standardized mistletoe lectin and arabinoside plant extracts, *Int. J. Neurorehabil.* 3 (2016) 2.
 - [24] L.L.S. Patriota, T.F. Procopio, J.S. Brito, V. Seba, A.P.S. Oliveira, A.K.A. Soares, L.R. Moreira, T.A. Lima, T. Soares, T.D. Silva, P.M.G. Paiva, V.M.B. Lorena, C.M.L. Melo, L.P. Albuquerque, T.H. Napoleão, *Microgramma vacciniifolia* (Polypodiaceae) fronds contain a multifunctional lectin with immunomodulatory properties on human cells, *Int. J. Biol. Macromol.* 103 (2017) 36–46.
 - [25] D.N. Khalil, E.L. Smith, R.J. Brentjens, J.D. Wolchok, The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 13 (2016) 273–290.
 - [26] H.J. McSorley, J.P. Hewitson, R.M. Maizels, Immunomodulation by helminth parasites: defining mechanisms and mediators, *Int. J. Parasitol.* 43 (2013) 301–310.
 - [27] I.E. Orhan, M.A. Mesaik, A. Jabeen, Y. Kan, Immunomodulatory properties of various natural compounds and essential oils through modulation of human cellular immune response, *Ind. Crops Prod.* 81 (2016) 117–122.
 - [28] D.M. Mosser, J.P. Edwards, Exploring the full spectrum of macrophage activation, *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 958–969.
 - [29] T.B.H. Geijtenbeek, S.I. Gringhuis, C-type lectin receptors in the control of T helper cell differentiation, *Nat. Rev. Immunol.* 16 (2016) 433–448.
 - [30] G. Li, Y. Gao, L. Cui, L. Wu, X. Yang, J. Chen, *Anguilla japonica* lectin 1 delivery through adenovirus vector induces apoptotic cancer cell death through interaction with PRMT5, *J. Gene Med.* 18 (2016) 65–74.
 - [31] J. Katlik, J. Svitel, P. Gemeiner, T. Kozar, J. Tkac, Glycan and lectin microarrays for glycomics and medicinal applications, *Med. Res. Rev.* 30 (2010) 394–418.
 - [32] A.A. Green, L. Hughes, Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solution of salts and organic solvents, in: S. Colowick, N. Kaplan (Eds.), *Methods in Enzymology*, Academic Press, New York, 1955, pp. 67–90.
 - [33] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275.
 - [34] D.H. Bing, J.G.M. Weyand, A.B. Stavitsky, Hemagglutination with aldehyde-fixed erythrocytes for assay of antigens and antibodies, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 124 (1967) 1166–1170.
 - [35] R.A. Reisfeld, U.J. Lewis, D.E. Williams, Disk electrophoresis of basic protein and peptides on polyacrylamide gels, *Nature* 195 (1962) 281–283.
 - [36] B.J. Davis, Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121 (1964) 404–427.
 - [37] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
 - [38] A.H. Ding, C.F. Nathan, D.J. Stuehr, Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production, *J. Immunol.* 141 (1988) 2407–2412.
 - [39] A. Sharma, T.B. Ng, J.H. Wong, P. Lin, Purification and characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris* cv. (Anasazi Beans), *J. Biomed. Biotechnol.* 2009 (2009) 929568.
 - [40] D.V. Pompeu, M.A. Mattioli, R.I.M.A. Ribeiro, D.B. Gonçalves, J.T. Magalhães, S. Marangoni, J.A. Silva, P.A. Granjeiro, Purification, partial characterization and antimicrobial activity of lectin from *Chenopodium quinoa* seeds, *Food Sci. Technol.* 35 (2015) 696–703.
 - [41] J.S. Coelho, N.D.L. Santos, T.H. Napoleão, F.S. Gomes, R.S. Ferreira, R.B. Zingali, L.C.B.B. Coelho, S.P. Leite, D.M.A.F. Navarro, P.M.G. Paiva, Effect of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae, *Chemosphere* 77 (2009) 934–938.
 - [42] G.M.S. Santana, L.P. Albuquerque, T.H. Napoleão, S.R. Souza, L.C.B.B. Coelho, P.M.G. Paiva, Electrochemical potential of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin, *Bioelectrochemistry* 85 (2012) 56–60.
 - [43] D.A. Araripe, V.R. Pinto-Junior, A.H.B. Neco, M.Q. Santiago, V.J.S. Osterne, A.F. Pires, C.F. Lossio, M.G.Q. Martins, J.L.A. Correia, R.G. Benevides, R.B. Leal, A.M.S. Assreuy, K.S. Nascimento, B.S. Cavada, Partial characterization and immobilization in CNBr-activated Sepharose of a native lectin from *Platypodium elegans* seeds (PELa) and comparative study of edematogenic effect with the recombinant form, *Int. J. Biol. Macromol.* 102 (2017) 323–330.
 - [44] V. Vila-del Sol, C. Punzón, M. Fresno, IFN- γ induced TNF- α expression is regulated by interferon regulatory factors 1 and 8 in mouse macrophages, *J. Immunol.* 181 (2008) 4461–4470.
 - [45] A.G. Duque, A. Descoteaux, Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases, *Front. Immunol.* 5 (2014) 491.
 - [46] L.C.N. Silva, N.M.P. Alves, M.C.A.B. Castro, V.R.A. Pereira, N.V.N. Paz, L.C.B.B. Coelho, R.C.B.Q. Figueiredo, M.T.S. Correia, Immunomodulatory effects of pCramoll and rCramoll on peritoneal exudate cells (PECs) infected and non-infected with *Staphylococcus aureus*, *Int. J. Biol. Macromol.* 72 (2015) 848–854.
 - [47] C.M.L. Melo, M.C.A.B. Castro, A.P. Oliveira, F.O.S. Gomes, V.R.A. Pereira, M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, P.M.G. Paiva, Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes, *Phytother. Res.* 24 (2010) 1631–1636.
 - [48] T. Tanaka, M. Narazaki, T. Kishimoto, Therapeutic targeting of the interleukin-6 receptor, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 52 (2012) 199–219.
 - [49] M.D. Leech, T.A. Barr, D.G. Turner, S. Brown, R.A. O'Connor, D. Gray, R.J. Mellanby, S.M. Anderton, Cutting Edge: IL-6-dependent autoimmune disease: dendritic cells as a sufficient, but transient source, *J. Immunol.* 190 (2013) 881–885.
 - [50] C.A. Hunter, S.A. Jones, IL-6 as a keystone cytokine in health and disease, *Nat. Immunol.* 16 (2015) 448–457.
 - [51] A. Kimura, T. Kishimoto, IL-6: regulator of Treg/Th17 balance, *Eur. J. Immunol.* 40 (2010) 1830–1835.
 - [52] C. Bogdan, Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update, *Trends Immunol.* 36 (2015) 161–178.
 - [53] D.J. Cua, C.M. Tato, Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system, *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2010) 479–489.
 - [54] J.M. Reynolds, P. Angkasekwinai, C. Dong, IL-17 family member cytokines: regulation and function in innate immunity, *Cytokine Growth Factor Rev.* 21 (2010) 413–423.
 - [55] C. Gu, L. Wu, X. Li, IL-17 family: cytokines, receptors and signaling, *Cytokine* 64 (2013) 477–485.
 - [56] A. Misiak, M.M. Wilk, M. Raverdeau, K.H.G. Mills, IL-17-producing innate and pathogen-specific tissue resident memory $\gamma\delta$ T cells expand in the lungs of *Bordetella pertussis*-infected mice, *J. Immunol.* 198 (2017) 363–374.
 - [57] H. Park, Z. Li, X.O. Yang, S.H. Chang, R. Nurieva, Y.H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian, C. Dong, A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17, *Nat. Immunol.* 11 (2010) 1133–1141.
 - [58] P. Miossec, J.K. Kolls, Targeting IL-17 and Th17 cells in chronic inflammation, *Drug Discov. Nat. Rev.* 11 (2012) 763–776.
 - [59] F. Annunziato, S. Romagnani, The transient nature of the Th17 phenotype, *Eur. J. Immunol.* 40 (2010) 3312–3316.
 - [60] A.F.B. Silva, M.P.V. Matos, M.T. Ralph, D.L. Silva, N.M. Alencar, M.V. Ramos, J.V. Lima-Filho, Comparison of immunomodulatory properties of mannose-binding lectins from *Canavalia brasiliensis* and *Cratylia argentea* in a mice model of *Salmonella* infection, *Int. Immunopharmacol.* 31 (2016) 233–238.
 - [61] M.H. Leshberg, A. Taubner, I. Albrecht, I. Lepenies, A. Richter, T. Kamradt, A. Radbruch, H. Chang, IFN- γ and IL-12 synergize to convert in vivo generated Th17 into Th1/Th17 cells, *Eur. J. Immunol.* 40 (2010) 3017–3027.
 - [62] S. Nakayama, H. Takahashi, Y. Kanno, J.J. O'Shea, Helper T cell diversity and plasticity, *Curr. Opin. Immunol.* 24 (2012) 297–302.
 - [63] K. Boniface, W.M. Blumenschein, K. Brovant-Porth, M.J. McGeachy, B. Basham, B. Desai, R. Pierce, T.K. McClanahan, S.S.R.W. Malefyt, Human Th17 cells comprise heterogeneous subsets including IFN- γ -producing cells with distinct properties from the Th1 lineage, *J. Immunol.* 185 (2010) 679–687.
 - [64] K.W. Moore, R.W. Malefyt, R.L. Coffman, A. O'Garra, Interleukin-10 and the Interleukin-10 receptor, *Annu. Rev. Immunol.* 19 (2001) 683–765.
 - [65] A. Chaudhry, R.M. Samstein, P. Treuting, Y. Liang, M.C. Pils, J. Heinrich, R.S. Jack, F.T. Wunderlich, J.C. Brünig, W. Müller, A.Y. Rudensky, Interleukin-10 signaling in regulatory T cells is required for suppression of Th17 cell-mediated inflammation, *Immunity* 34 (2011) 566–578.
 - [66] K.N. Couper, D.G. Blount, E.M. Riley, IL-10: The master regulator of immunity to infection, *J. Immunol.* 180 (2008) 5771–5777.
 - [67] S.C. Edwards, S.C. Higgins, K.H.G. Mills, Respiratory infection with a bacterial pathogen attenuates CNS autoimmunity through IL-10 induction, *Brain Behav. Immun.* 50 (2015) 41–46.
 - [68] P.A. Bretscher, A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 185–190.
 - [69] Y. Ando, G. Yang, T.P. Kenny, K. Kawata, W. Zhang, W. Huang, P.S.C. Leung, Z. Lian, K. Okazaki, Overexpression of microRNA-21 is associated with elevated pro-inflammatory cytokines in dominant-negative TGF- β receptor type II mouse, *J. Autoimmun.* 41 (2013) 111–119.
 - [70] C.E. Rudd, A. Taylor, H. Schneider, CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction, *Immunol. Rev.* 229 (2009) 12–26.
 - [71] B. Salomon, J.A. Bluestone, Complexities of CD28/b7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation, *Annu. Rev. Immunol.* 19 (2001) 225–252.
 - [72] L.S.K. Walker, Treg and CTLA-4: Two intertwining pathways to immune tolerance, *J. Autoimmun.* 45 (2013) 49–57.