UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Ocorrência e distribuição de BanLec em cultivares de banana e avaliação da sua atividade imunomoduladora *in vivo*

Ana Cláudia Miranda Brito Sansone

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento

São Paulo

2014

ANA CLÁUDIA MIRANDA BRITO SANSONE

Ocorrência e distribuição de BanLec em cultivares de banana e avaliação da sua atividade imunomoduladora *in vivo*

Tese apresentada ao Departamento de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Doutor em Ciências dos Alimentos.

Área de Concentração: Bromatologia

Orientador: Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Sansone, Ana Cláudia Miranda Brito
S229o Ocorrência e distribuição de BanLec em cultivares de banana e avaliação da sua atividade imunomoduladora *in vivo* / Ana Cláudia Miranda Brito Sansone. -- São Paulo, 2014.
88p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental
Orientador : Nascimento, João Roberto Oliveira do

1. Ciência dos alimentos 2. Banana : Bioquímica dos alimentos I. T. II. Nascimento, João Roberto Oliveira do, orientador.

641 CDD

ANA CLÁUDIA MIRANDA BRITO SANSONE

Ocorrência e distribuição de BanLec em cultivares de banana e avaliação da sua atividade imunomoduladora *in vivo*

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento
Orientador/Presidente

_____
1º. Examinador

_____
2º. Examinador

_____
3º. Examinador

_____
4º. Examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2014.

DEDICATÓRIA

Aos meus familiares, em especial ao meu avô, José Galdino de Moura Sobrinho (*in memorian*), que desde que eu era adolescente já me chamava de doutora.

Ao meu marido Marcelo Sansone com amor e gratidão por todo apoio, carinho e compreensão desde o primeiro dia em que ficamos juntos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e todo o plano espiritual pela força, proteção e por colocar pessoas maravilhosas na minha vida. Eu sou uma pessoa de sorte.

À Profª Beatriz Cordenunsi, por ter acreditado que esse desafio daria certo, pelos incentivos, por ter me apresentado ao meu orientador e por ser tão carinhosa e protetora com todos os alunos.

Ao Prof. João Roberto Nascimento, pela paciência, por ter me tirado “da zona de conforto” em várias situações, me ensinando a trabalhar como pesquisadora, e ainda, pelas conversas informais, sendo muito mais do que um orientador.

Às doutoras Fernanda Helena G Peroni Okita e Claudinéia Soares, por disponibilizarem as amostras de bananas que foram de fundamental importância para o início desse trabalho.

Aos professores Neuza Hassimoto e Eduardo Purgatto, pelas conversas filosófico-científicas, principalmente na hora do almoço.

Às técnicas do laboratório de Química, Bioquímica e Biologia Molecular de Alimentos, por todos os serviços prestados, por algumas broncas e muitos momentos de descontração. Agradecimento especial à Lúcia Justino, pela imensa ajuda nos ensaios *in vivo*.

Aos alunos do laboratório, mesmo aqueles que já seguiram outro caminho, mas que de alguma forma agitaram bem a minha vida ao longo desses anos. Fiz boas amizades!

Um agradecimento especial à todos aqueles que trocaram as minhas diálises (rs) e ao Marcelo Sansone, pela enorme contribuição nos experimentos *in vivo*.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, pela competência e presteza.

Aos amigos, que são os membros da nossa família que podemos escolher e que de alguma forma fazem com que momentos difíceis se tornem mais divertidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa durante o período de 08/2010 a 07/2014.

Às funcionárias do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Instituto de Química – USP, em especial a Flávia Ong, sempre tão calma e prestativa.

À Profª Marija Gavrovic-Jankulovic (Faculdade de Química, Universidade de Belgrado, Sérvia), que forneceu gentilmente uma amostra de BanLec recombinante e do anticorpo anti-BanLec, possibilitando a realização de vários ensaios, além do envio de publicações relacionadas ao trabalho, quando solicitado.

Às técnicas de laboratório do Departamento de Analises Clínicas e Toxicológicas: Renata Albuquerque, pelo auxílio com a citometria de Fluxo, Kátia Françoso, pela orientação na técnica ELISA e Mariana Cristina, com dicas sobre o ensaio de hemaglutinação.

À profª Patrícia Gama (ICB I - USP) pela paciência e gentileza nos ensaios utilizando intestino dos camundongos.

Ao técnico Cruz Alberto (Júnior) pela coleta dos intestinos de camundongos, sempre bem humorado e muito competente.

E por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse concluído.

“A única maneira de não cometer erros é fazendo nada.
Este, no entanto, é certamente um dos maiores erros que
se poderia cometer em toda uma existência”
Confúcio

RESUMO

SANSONE, A.C.M.B. **Ocorrência e distribuição de BanLec em cultivares de banana e avaliação da sua atividade imunomoduladora *in vivo*.** 2014. 88f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Lectinas são proteínas cuja principal característica é a de se ligar específica e reversivelmente a carboidratos. BanLec é a lectina presente na polpa de bananas, que se liga especificamente a manose e glicose, e é capaz de induzir a proliferação de células T, podendo estimular a resposta imune. Existem indícios de que o teor de BanLec pode variar dependendo do estádio de amadurecimento e do tipo de cultivar, o que pode afetar a quantidade de BanLec existente na fruta quando consumida *in natura* e a possível resposta imune frente ao consumo de banana. Por este motivo, um dos objetivos desse trabalho foi determinar os teores e a atividade hemaglutinante de BanLec em extratos de farinha de banana verde, além de bananas das cultivares Pacovan, Figo, Terra, Mysore e Nanicão, nos estádios de maturação verde e maduro, e submetidas a tratamento com 1-MCP e baixa temperatura (para cv. Nanicão). Com vista a atender ao objetivo de avaliar seus efeitos imunomoduladores *in vivo*, a BanLec foi purificada da cultivar Nanicão e administrada por via oral a camundongos BALB/c. Os ensaios de atividade hemaglutinante dos extratos de banana apontaram para maior quantidade de BanLec no fruto maduro, quando comparado ao verde, e ausência dessa proteína na cultivar Figo. Os parâmetros imunológicos analisados após administração de BanLec aos camundongos demonstram que a resposta imune gerada após ingestão de BanLec é dose dependente, além disso, a administração de 50 μg de BanLec aos animais foi capaz de modular citocinas importantes na resposta imunológica, provavelmente causando um efeito que pode ser interpretado como mais protetor do que patogênico. Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que existem diferenças nos teores de BanLec dependendo da cultivar e estádio de maturação analisado, sendo que essa proteína não está presente na polpa de todas as variedades de banana e finalmente, que ela tem grande potencial imunomodulador *in vivo*, uma vez que ativou citocinas de resposta anti-inflamatória.

Palavras-chave: BanLec, atividade biológica, efeito imunomodulador, ingestão oral, estudos *in vivo*.

ABSTRACT

SANSONE, A.C.M.B. **Occurrence and distribution of BanLec in banana cultivars and evaluation of its immunomodulatory activity *in vivo*.** 2014. 88f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Lectins are proteins which bind specifically and reversibly to carbohydrates. BanLec is the lectin present in banana pulp, and it binds to mannose and glucose, being capable of inducing T-cell proliferation, and to stimulate the immune response. There are some evidence that the amount of BanLec may vary depending on the maturation stage of the fruit and the cultivar (cv.), which may affect the amount of BanLec and the possible immune response after consumption of banana. Thus, this study aimed to evaluate the amount of BanLec and its hemagglutinating activity in crude extracts of bananas from cultivars Pacovan, Figo, Terra, Mysore and Nanicão, in both unripe and ripe maturation stage, and also fruits which were treated with 1-MCP and low temperature. In addition, in order to access their immunomodulatory effects *in vivo*, BanLec was purified by affinity chromatography and administered orally to BALB/c mice. The hemagglutinating activity assays indicate higher amount of BanLec in ripe fruit. Moreover, the possible was undetectable in the pulp of banana Figo. The immunological parameters of mice orally fed with BanLec showed that the immunological response is dependent on the amount of protein administrated, in agreement to previous *in vitro* studies. Besides, 50 μg of BanLec, were able to modulate some cytokines in immune response, causing an effect that seems to be more protective than pathogenic. We conclude that there are important differences in amount of BanLec depending on the cultivar and the maturation stage, and BanLec has a dose-dependent immunomodulatory effect *in vivo*.

Keywords: BanLec, biological activity, immunomodulatory effect, oral intake, *in vivo* assay.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura tridimensional de Banlec de *Musa acuminata*, em que fitas de folha β antiparalelas estão representadas como flechas, conectadas por voltas reversas. No topo de cada monômero da proteína estão evidenciados os sítios de ligação a carboidratos (sítio I e sítio II). Adaptado de MEAGHER et al. (2005)..... 9

Figura 2. Ensaio de atividade hemaglutinante utilizando hemácias de coelho 2% em placa de microtitulação. As letras à esquerda da tabela representam as linhas, sendo C para o controle, V e M para extratos de banana verde e madura, respectivamente. Os números acima das colunas da esquerda para a direita representam: extrato puro (coluna 1), extrato diluído 1:2 (coluna 2) e assim sucessivamente até a coluna 11, que representa a diluição 1:1024. O poço na linha C, coluna 12, corresponde ao controle negativo..... 32

Figura 3. Distribuição dos títulos de hemaglutinação de todas as cultivares. A análise estatística pelo método de Turkey demonstrou que extratos de bananas maduras apresentaram títulos de hemaglutinação significativamente maiores do que os extratos de bananas verdes ($p < 0,05$). As barras abaixo e acima da caixa indicam o menor e maior valor observado, respectivamente.....35

Figura 4. Distribuição dos títulos de hemaglutinação utilizando extratos de banana verde e madura da cultivar Terra. A análise estatística pelo método de Turkey demonstrou que extratos de bananas maduras apresentaram títulos de hemaglutinação significativamente maiores do que os extratos de bananas verdes ($p < 0,05$). As barras abaixo e acima da caixa indicam o menor e maior valor observado, respectivamente..... 36

Figura 5. Distribuição dos títulos de hemaglutinação utilizando extratos brutos de banana verde e madura da cultivar Nanicão. A: bananas submetidas a armazenamento com baixa temperatura; B: bananas submetidas a tratamento com 1-MCP; C e D: respectivos controles das amostragens. A análise estatística pelo método de Turkey demonstrou que extratos de bananas maduras apresentaram títulos de hemaglutinação significativamente maiores do que os extratos de bananas verdes ($p < 0,05$). As barras abaixo e acima da caixa indicam o menor e maior valor observado, respectivamente..... 37

Figura 6. Imunodetecção de BanLec em extratos de proteínas de bananas das cultivares Pacovan, Mysore, Figo e Terra, nos estádios de maturação verde e maduro. A e B: SDS-PAGE corado para proteínas totais com azul de coomassie. C e D: Western blotting em membrana de nitrocelulose para detecção de BanLec anticorpo anti-BanLec de coelho (diluição 1:2000) usando extratos de banana. Os números à esquerda de cada banda do padrão correspondem às respectivas massas moleculares.....39

Figura 7. Perfil eletroforético e Imunodetecção de BanLec em extratos de proteínas de bananas da cultivar Nanicão. **A:** SDS-PAGE corado para proteínas totais com azul de coomassie. **B:** Western blotting em membrana de nitrocelulose para detecção de BanLec utilizando anticorpo anti-BanLec de coelho (diluição 1:2000), usando extratos de banana. Os números à esquerda de cada banda do padrão correspondem às respectivas massas moleculares. 1: Massa molecular KDa); 2: Banana verde submetida tratamento com 1-MCP; 3: Banana madura submetida a tratamento com 1-MCP; 4: Banana verde submetida a armazenamento a baixa temperatura; 5: Banana madura submetida a armazenamento a baixa temperatura; 6: Banana verde do grupo não tratado; 7: Banana madura do grupo não tratado e 8: extrato de farinha de banana verde..... 41

Figura 8. Índice de cor da casca (PCI) de acordo com a escala de cor comercialmente utilizada. Adaptado de AURORE et al, 2009..... 48

Figura 9. Perfil eletroforético e imunorreativo de preparações de BanLec **A:** SDS-PAGE 15% acrilamida de amostras de BanLec purificadas da polpa de banana cultivar Nanicão, visualizadas através da coloração para proteínas totais com azul de coomassie. **B:** Imunodetecção de BanLec por Western blotting em membrana de nitrocelulose de amostras de BanLec purificadas da polpa de banana cultivar Nanicão, revelada com substrato cromogênico NBT/BCIP. Os números à esquerda de cada banda de padrão correspondem às respectivas massas moleculares (MM). De A a J: lotes de purificação realizados. L: BanLec recombinante..... 56

Figura 10. Ensaio de atividade biológica de BanLec, com hemácias de coelho 2% em placa de microtitulação. O ensaio foi feito em duplicada e o extrato de feijão cru foi utilizado como controle positivo da reação, em diluição seriada de fator dois; da esquerda para a direita, o primeiro poço corresponde ao extrato puro, o segundo à diluição 1:2 e assim por diante. No caso de BanLec, o primeiro poço à esquerda corresponde a concentração de 0,25 μg/mL, e as diluições a partir dessa concentração foram: 1:100, 1:1000, 1:2000, 1:2500, 1:3000; 1:3500, 1:4000..... 57

Figura 11. Título de hemaglutinação de BanLec isolada da polpa de banana da cultivar Nanicão. O teste foi realizado em duplicada em microplaca de titulação utilizando hemácias de coelho 2%, previamente tripsinizadas. As diluições partiram da concentração inicial de BanLec de 0,25 μg/mL..... 58

Figura 12. Representação da distribuição de células do sangue periférico de camundongos BALB/c após análise por citometria de fluxo. **A:** Destacado em vermelho estão os linfócitos, que são células de pequena granularidade (eixo y - Side scatter - **SSC**) e pequeno tamanho (eixo x - Forward scatter – **FSC). B:** Destacado em azul, estão os linfócitos marcados com CD45FITC..... 59

Figura 13. Representação da distribuição de células do timo de camundongos BALB/c após análise por citometria de fluxo. **A:** Destacado em vermelho estão os linfócitos, que são células de pequena granularidade (eixo y - Side scatter - **SSC**) e pequeno tamanho (eixo x - Forward scatter – **FSC). B:** Destacado em azul, estão os linfócitos marcados com CD45FITC.....59

Figura 14. Estratégia de *gate* utilizada para análise de linfócitos T CD4 no sangue periférico. Destaque para o quadro rosa, porcentagem dos linfócitos CD3+/CD4+ **A:** animais do grupo controle; **B:** animais do grupo BanLec 50..... 62

Figura 15. Concentração de citocinas no sangue periférico de camundongos BALB/c. As barras em cinza escuro correspondem aos animais do grupo Controle e as barras em cinza claro o grupo BanLec 50. Foi utilizado o teste de comparação de médias Tukey. Os asteriscos representam as diferenças estatisticamente significantes, sendo (**) p< 0,01 e (*) p<0,05..... 68

Figura 16. Concentração de citocinas no timo de camundongos BALB/c. As barras em cinza escuro correspondem aos animais do grupo Controle e as barras em cinza claro o grupo BanLec 50. Foi utilizado o teste de comparação de médias Tukey (p < 0,05)..... 68

Figura 17. Distribuição da concentração de IL-6 no sangue periférico de camundongos BALB/c do grupo Controle e BanLec 50, utilizando o teste de comparação de médias Tukey. As barras abaixo da caixa indicam os menores valores observados para IL-6.....70

Figura 18. Distribuição da concentração de TNFα no sangue periférico de camundongos BALB/c do grupo Controle e BanLec 50, utilizando o teste de comparação de médias Tukey. As barras acima da caixa indicam os maiores valores observados para TNFα..... 71

Figura 19. Peso dos animais do grupo BanLec 50 (□) e animais do grupo Controle (■). As medições foram feitas dois dias antes do início do experimento e até a eutanásia do animal. Foi utilizado o teste de comparação de médias Tukey para avaliação de diferença estatisticamente significante (p < 0,05), as barras indicam o desvio padrão..... 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cultivares de banana e respectivos subgrupos e grupos genômicos..... 26

Tabela 2. Grupos de animais tratados com BanLec (n= 5 em cada grupo)..... 51

Tabela 3. Grupos de animais tratados com BanLec (n= 25 em cada grupo)..... 52

Tabela 4. Medianas e desvios padrões nas porcentagens dos linfócitos T no sangue periférico de camundongos BALB/c submetidos a tratamento com BanLec. Destacado em verde, a diminuição de população de linfócitos T CD4 no grupo BanLec 50..... 60

Tabela 5. Medianas e desvios padrões nas porcentagens dos linfócitos T no timo de camundongos BALB/c submetidos a tratamento com BanLec. Destacado em verde e laranja, diminuição e aumento, respectivamente, das populações de células analisadas..... 61

Tabela 6. Teste de Wilcoxon para amostras não pareadas para avaliar o efeito de BanLec sobre linfócitos T e citocinas no sangue periférico de camundongos..... 63

Tabela 7. Teste de Wilcoxon para amostras não pareadas para avaliar o efeito de BanLec sobre linfócitos T e citocinas no timo de camundongos..... 63

Tabela 8. Resultado das médias e desvio padrão nas porcentagens dos linfócitos T no sangue periférico de camundongos BALB/c que foram submetidos a tratamento por via oral com 50 μg de BanLec, além do grupo controle.....67

Tabela 9. Resultado das médias e desvio padrão nas porcentagens dos linfócitos T no timo de camundongos BALB/c que foram submetidos a tratamento por via oral com 50 μg de BanLec, além do grupo não tratado. Destacado em verde e em laranja, diminuição e aumento, respectivamente, das populações de células analisadas..... 67

Tabela 10. Resultado do teste de Tukey para avaliar efeito imunomodulador no sangue periférico e timo dos camundongos do grupo BanLec 50..... 67

LISTA DE ABREVIATURAS

μL	microlitro
μg	micrograma
°C	graus Celsius
1-MCP	1 Metilciclopropeno
APC Cy7	aloficocianina 7
APC	célula apresentadora de antígeno
ArtinM	lectina extraída de *Artocarpus heterophyllus*
BanLec	banana Lectin (lectina de banana)
BCIP	*5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*
CD	*cluster of differentiation*
Con A	concanavalina A
DSC	calorimetria diferencial de varredura
DTT	ditiotreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EBL	lectina de banana da cultivar ‘Emperor’
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
ELISA	*enzyme-linked immunosorbent assay*
FITC	isotiocianato de fluoresceína
g	aceleração gravitacional
g	grama
gp	glicoproteína
GSL	lectina extraída de *Gymnopilus spectabilis*
HIV-1	vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1
IFNγ	interferon gama
IgG	imunoglobulina G
IL	interleucina
KDa	quilodalton
Ltda	limitada
M	molar
mg	miligrama

MHC	complexo de histocompatibilidade principal
mL	mililitro
mM	milimolar
nBanLec	lectina extraída da polpa de banana
NBT	*nitro-blue tetrazolium chloride*
PBL	lectina extraída de *Parkia biglobosa*
PBS	solução salina tamponada com fosfato
PCI	*Peel Colour Index*
PE Cy7	ficoeritrina cianina 7
PE	ficoeritrina
PerCP	proteína peridina clorofila-A
pH	potencial hidrogeniônico
PHA	*Phytohemagglutinin* (fitohemaglutinina)
PlanLec	lectina de banana do tipo plátano
POL	lectina extraída de *Pleurotus ostreatus*
rBanLec	forma recombinante da lectina de banana
rpm	rotações por minuto
SDS PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SFB	soro fetal bovino
SGF	simulado de fluido gástrico
SIF	simulado de fluido intestinal
TBS	solução salina tamponada com Tris
TBS-T	solução salina tamponada com Tris contendo Tween
TCR	receptor de célula T
Th	T helper (linfócito T helper)
TNFα	fator de necrose tumoral alfa
V	volt

SUMÁRIO

RESUMO

PREFÁCIO

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO..... 01

1.1 Lectinas..... 01
1.2 BanLec..... 07
1.3 Cultivares de banana e manejo pós-colheita..... 13
1.4 Objetivos do estudo..... 16
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 17

CAPÍTULO II – EFEITO DAS CULTIVARES E ESTÁDIO DE MATURAÇÃO NOS PERFIS DE BANLEC..... 24

2.1 RESUMO..... 24
2.2 INTRODUÇÃO..... 25
2.3 MATERIAL E MÉTODOS..... 25
2.3.1 Material..... 25
2.3.1.1 Banana..... 25
2.3.1.2 Sangue de coelho..... 27
2.3.2 Métodos..... 27
2.3.2.1 Extração de proteínas de banana com 1,3- diaminopropano..... 27
2.3.2.2 Extração de proteínas de banana com fenol..... 27
2.3.2.3 Extração de proteínas de feijão..... 28
2.3.2.4 Separação das hemácias do sangue de coelho..... 28
2.3.2.5 Tripsinização das hemácias..... 29
2.3.2.6 Ensaio de hemaglutinação..... 29
2.3.2.7 SDS-PAGE..... 29
2.3.2.8 Coloração dos géis de poliacrilamida..... 30

2.3.2.9 Western blotting.....30

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO……..… 31

2.4.1 Ensaios de hemaglutinação……..……..... 31

2.4.2 Perfil eletroforético e Imunodetecção de BanLec nos extratos de banana.....…….38

2.5 CONCLUSÕES.....…….……41

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS……....42

CAPÍTULO III – BANLEC INGERIDA POR VIA ORAL É CAPAZ DE MODULAR O SISTEMA IMUNE DE CAMUNDONGOS.....44

3.1 RESUMO.....44

3.2 INTRODUÇÃO..... 45

3.3 MATERIAL E MÉTODOS..... 47

3.3.1 Material..... 47

3.3.1.1 Banana..... 47

3.3.1.2 Camundongos.....…..... 48

3.3.2 Métodos..... 48

3.3.2.1 Extração de proteínas de banana com 1,3-diaminopropano..... 48

3.3.2.2 Purificação de BanLec.....49

3.3.2.3 SDS-PAGE..... 49

3.3.2.4 Coloração dos géis de poliacrilamida.....49

3.3.2.5 Western blotting.....50

3.3.2.6 Ensaio de hemaglutinação..... 50

3.3.2.7 Delineamento experimental – Estudo piloto.....50

3.3.2.8 Delineamento experimental – Estudo principal..... 51

3.3.2.9 Contagem global de leucócitos no sangue periférico dos animais..... 52

3.3.2.10 Contagem global de leucócitos no timo dos animais..... 52

3.3.2.11 Análise da população de linfócitos por citometria de fluxo.....53

3.3.2.12 Análise de citocinas por citometria de fluxo..... 53

3.3.2.13 Análise estatística.....54

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 54

3.4.1 Purificação de BanLec..... 54

3.4.2 Perfil eletroforético e Imunodetecção de BanLec..... 55

3.4.3 Ensaio de hemaglutinação……...57

3.4.4 Estudo piloto……...58

3.4.5 Estudo principal……..… 65

3.5 CONCLUSÕES.....……....73

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 74

CAPÍTULO IV – CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS..... 80

ANEXO 1: Informações gerais sobre a ração administrada aos camundongos durante o experimento *in vivo*..... 82

ANEXO 2: Estudo piloto: Protocolo de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP nº 416.....83

ANEXO 3: Estudo piloto: Protocolo de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP nº 448.....84

ANEXO 4: Sequenciamento de banda de gel de eletroforese para identificação de proteínas 85

ANEXO 5: Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/ Doutorado..... 86

ANEXO 6: Ficha do Aluno.....87

PREFÁCIO

O presente documento está dividido em três capítulos em que serão abordados questões referentes à BanLec, uma lectina presente na polpa de bananas.

No capítulo I é feita uma introdução às lectinas, proteínas amplamente presentes na natureza, sendo discutidas suas principais características e apresentadas informações a respeito da lectina presente em polpa de bananas, bem como as razões que motivaram o estudo mais aprofundado dessa proteína.

No capítulo II são apresentados estudos *in vitro* realizados com BanLec provenientes de cinco diferentes cultivares de bananas, nos estádios de maturação verde e maduro, de modo a prover informações sobre eventuais diferenças nos perfis de BanLec, e sua dependência do estádio de maturação e da cultivar analisada.

O capítulo III traz as etapas de isolamento e purificação dessa proteína para os ensaios *in vivo*, sendo apresentados os resultados da administração dessa proteína por gavagem a camundongos da linhagem Balb/c, como vista a comprovar os efeitos imunomoduladores de BanLec já relatados em estudos *in vitro*.

Por fim, segue um breve resumo do conjunto dos resultados obtidos e a partir dessas informações, são apresentadas algumas perspectivas de investigação de BanLec.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1.1. Lectinas

Lectinas são proteínas de origem não imune capazes de reconhecer e se ligar reversivelmente a carboidratos, independentemente da fonte, sem alterar sua estrutura covalente (PUSZTAI; BARDOCZ, 1996; SHARON; LIS, 2004). A maioria das lectinas de plantas reconhece e interage com unidades não redutoras de oligo e polissacarídeos e polímeros complexos, como glicoproteínas e glicolípides (GOLDSTEIN, 2002).

A definição acima só foi elaborada muitas décadas após a descoberta totalmente ao acaso dessas proteínas, em 1888, quando um pesquisador que estudava a toxicidade das sementes de mamona (*Ricinus communis*) ao misturar sangue de animais com extrato aquoso dessa planta, observou que as hemácias aglutinavam (FREED, 1985; RÜDIGER; GABIUS, 2001). Esse foi o primeiro relato descrito em literatura das hemaglutininas ou fitoaglutininas, como eram inicialmente chamadas as lectinas.

Ainda que Stillmark em 1888 tenha sido o primeiro pesquisador a relatar a característica hemaglutinante destas proteínas em plantas, alguns anos antes, S. Weir Mitchel provavelmente foi o primeiro pesquisador a observar a atividade envolvendo lectinas *per se,* utilizando veneno de cobra (KILPATRICK, 2002). Em 1902, pesquisadores da Universidade da Pensilvânia, nos Estados Unidos, publicaram um estudo detalhado sobre aglutinação e lise de eritrócitos e leucócitos por uma variedade de venenos de cobras. Na época, eles atribuíram tais fenômenos a “corpos intermediários”, que eram produtos de reações imunológicas.

De fato, embora as lectinas estejam presentes em todos os organismos vivos, desde plantas e animais, a bactérias e fungos (GONZALEZ DE MEJÍA; PRISECARU, 2005) as plantas são a fonte mais abundante dessas proteínas, especialmente nas sementes ou seus tecidos de estocagem. A exemplo disso podemos citar a ricina, lectina extraída da semente da mamona, e a concanavalina A (con A), extraída do feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*). Entretanto, essas proteínas podem ser encontradas em todos os órgãos vegetais, como caule, raízes,

tubérculos, folhas e também em alguns frutos (FREED, 1985; RÜDIGER; GABIUS, 2001; GONZALEZ DE MEJÍA; PRISECARU, 2005).

Por muito tempo, as lectinas não tiveram muita atenção da comunidade científica, pois se acreditava que a capacidade de aglutinar eritrócitos eram as suas principais características, e que estivessem presentes somente em plantas, sem uma grande função específica. Até que em meados da década de 30, os pesquisadores Sumner e Hower isolaram e purificaram a con A, lectina que se tornaria uma das mais estudadas (SHARON; LIS, 2004). Esses pesquisadores observaram que a hemaglutinação da con A era inibida por carboidratos de baixo peso molecular como a sacarose, sendo, portanto, sugerido que na hemaglutinação envolvendo lectinas ocorre a ligação destas proteínas com carboidratos presentes na superfície das hemácias (SUMNER; HOWELL, 1936), ao contrário de uma reação de hemaglutinação imunológica, onde ocorre uma ligação antígeno-anticorpo levando a formação de complexos imunes.

Além da especificidade de ligação para carboidratos, a propriedade hemaglutinante das lectinas parece também estar relacionada com a espécie animal e tipo sanguíneo. Na década de 40, a especificidade de lectinas para o grupamento sanguíneo do sistema ABO foi comprovada, quando pesquisadores testaram extratos do feijão-fava (*Phaseolus limensis*) e de ervilhaca tufada (*Vicia cracca*) e observaram que estes extratos aglutinavam eritrócitos do grupo sanguíneo A, mas não do grupo B ou O (SHARON; LIS, 2004). Essa característica de ligação seletiva para grupos sanguíneos dentro do sistema ABO decorre do reconhecimento específico de diferentes estruturas de carboidratos na superfície das células (PUSZTAI et al., 2008) e foi pela capacidade de distinguir eritrócitos de diferentes tipos sanguíneos que em 1954, William C. Boyd e Elizabeth Shapleigh propuseram para esse grupo distinto de proteínas o nome lectina, que vem do latim e significa selecionar, escolher (BOYD; SHAPLEIGH, 1954).

Em meados de 1960, a tarefa de purificar lectinas se tornou menos complicada com a introdução da técnica de cromatografia por afinidade por Irwin J. Goldstein, originalmente utilizando dextrana imobilizada (Sephadex) para obter con A, o que aumentou consideravelmente o número de lectinas isoladas de animais e, principalmente, de fontes vegetais (SHARON, 2008). A partir de então, lectinas de diversas fontes foram isoladas e purificadas, tendo como principal objetivo estudos

de interações célula-célula, estímulo mitogênico em linfócitos T, aglutinação de células tumorais, entre outros (SHARON; LIS, 2004). As análises estruturais e moleculares dessas proteínas isoladas permitiram conhecer mais detalhadamente suas características, além de poder distingui-las estruturalmente.

LORIS (2002) comparou estruturas de lectinas provenientes de fontes animais e de plantas. Ele relatou que embora sejam estruturas diferentes, essas lectinas apresentam algumas propriedades em comum. Lectinas animais do tipo C e lectinas de leguminosas dependem da ligação com íons metálicos divalentes para que o sítio de ligação a carboidratos esteja ativo. Desse modo, a perda de íons metálicos causa mudanças na conformação da proteína, destruindo a funcionalidade de ligação específica a carboidratos. Além disso, esse autor relatou outra característica em comum de lectinas de leguminosas e lectinas do tipo C; na estrutura dessas proteínas existe um sítio primário de ligação que embora seja específico para um determinado monossacarídeo, é de baixa afinidade. Subsítios adjacentes a esse sítio primário aumentam a afinidade para di e oligossacarídeos e neles só se ligam carboidratos covalentemente ligados àqueles do sítio primário, o que permite um aumento na afinidade das lectinas aos carboidratos (LORIS et al., 1998).

As lectinas presentes na superfície de células bacterianas parecem ter papel de adesão à célula do hospedeiro no início da infecção (SHARON, 2008), principalmente aquelas do trato urinário e gastrointestinal. O trabalho realizado por SHARON e LIS (1989) mostrou que *Escherichia coli* (*E. coli*) aderiu facilmente em células epiteliais da boca, e que essa adesão foi inibida na presença de manose e metil α-manosídeo, bem como com tratamento prévio com Con A. Dessa forma, é razoável pensar que as lectinas possam ser utilizadas como forma de terapia anti-adesão, principalmente no caso de doenças causadas por bactérias. De fato, a atividade antimicrobiana da lectina extraída do cogumelo *Gymnopilus spectabilis* (GSL) foi demonstrada por ALBORÉS et al. (2014) a partir da inibição de crescimento de *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, e *Aspergillus niger* em placas de cultura utilizando 200 μg de GSL.

Por outro lado, lectinas de animais geralmente são consideradas moléculas de reconhecimento do sistema imune, trabalhando na primeira linha de defesa contra patógenos e imunoregulação (KILPATRICK, 2002). Além disso, podem ser

utilizadas como moléculas carreadoras de drogas, principalmente em casos de câncer e doenças imunes (DANGUY et al., 2002).

As lectinas de plantas, em especial de leguminosas, apresentam semelhanças nas suas estruturas primárias, porém, elas possuem especificidade por diferentes carboidratos (NASI et al., 2009), o que pode ocasionar diferenças nas suas atividades biológicas.

Evidências de que as lectinas exercem um papel de proteção nas plantas começaram a surgir em 1976, quando um grupo de pesquisadores alimentou larvas do besouro *Callosobruchus maculatus*, que é patogênico para o feijão, com isolados de lectina de feijão preto, resultando na morte dos animais (SHARON; LIS, 2004). Desde então, várias outras lectinas de plantas foram estudadas e tiveram sua ação inseticida comprovada. Como exemplo, HABIBI et al. (2000), que em estudos anteriores observaram a ligação da fitohemaglutinina (*Phytohemagglutinin*, PHA), a lectina do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), com células do intestino de insetos causando intumescimento do tecido e morte celular, relatando a atividade inseticida dessa proteína frente a diversos patógenos.

Embora as funções que as lectinas de plantas exercem não tenham sido totalmente elucidadas ainda, parece claro que seus efeitos não estão restritos às atividades inseticidas.

Os efeitos imunomodulatórios de lectinas presentes em diversas plantas foram descritos por SOUZA et al. (2013), demonstrando o papel das lectinas na resposta contra infecções, que pode ser estimulando ou suprimindo o sistema imune. Esses pesquisadores relataram anteriormente que a ArtinM, lectina extraída de sementes de jaca (*Artocarpus heterophyllus)* foi capaz de induzir a produção de interleucina 12 (IL-12) em camundongos e desenvolver a resposta imune adaptativa mediada por Th1, sendo que essa resposta foi dependente da concentração da lectina (PANUNTO-CASTELO et al., 2001).

Além disso, estudos envolvendo lectinas de cogumelos ou fungos comestíveis realizados nas últimas décadas estão em crescente desenvolvimento, devido ao interesse em suas atividades imunomodulatórias, antitumorais, entre outras. WANG et al. (2000) relataram que a lectina extraída do shimeji preto (*Pleurotus ostreatus* - POL) apresentou intensa atividade antitumoral. Após terem sido inoculados com células tumorais (sarcoma S-180 e hepatoma H-22), camundongos tratados com a POL, além apresentarem tumores menores quando

comparados ao grupo controle não tratado com a lectina, também tiveram uma taxa de sobrevida maior.

Outra importante propriedade envolvendo lectinas foi descrita por SILVA et al. (2013), em que camundongos que tiveram contrações abdominais induzidas pela injeção de ácido acético 0,6% apresentaram diminuições no número de contrações em 34% a 58% dos casos, de acordo com a dose de PBL (lectina extraída da semente de *Parkia biglobosa*) administrada via endovenosa, demonstrando o efeito antinociceptivo dessa lectina. Além disso, essa lectina apresentou potente efeito anti-inflamatório frente ao processo inflamatório agudo a que os animais foram submetidos.

De maneira geral, as proteínas provenientes da dieta são degradadas durante a passagem pelo trato gastrintestinal por enzimas digestivas (PUSZTAI; BARDOCZ, 1996). Contudo, quase todas as lectinas de plantas são resistentes às enzimas proteolíticas do estômago e intestino (RÜDIGER; GABIUS, 2001; GONZALEZ DE MEJÍA; PRISECARU, 2005), passando pelo trato gastrointestinal e permanecendo biologicamente ativas no intestino delgado. Dessa forma, as lectinas podem se ligar ao enterócitos e promover mudanças como a ruptura das microvilosidades e desorganização das principais células absortivas, e também podem diminuir a absorção de nutrientes (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004). Esses efeitos podem ser observados especialmente quando as lectinas são consumidas em altas quantidades (PUSZTAI; BARDOCZ, 1996). Por isso, é importante conhecer a quantidade de lectina presente nos alimentos, e de que forma elas interagem com o nosso organismo.

Sabe-se que a ingestão de feijão cru pode gerar efeitos tóxicos, como náuseas, diarréia e outros problemas gastrointestinais (NASI et al., 2009). Por este motivo, o consumo de alguns alimentos ricos em lectinas, como é o caso da PHA, só é recomendado após cozimento a altas temperaturas, para que haja a desnaturação desta proteína e a diminuição dos seus efeitos tóxicos no organismo. Em outro exemplo de efeito deletério após ingestão de lectinas, NASI et al. (2009) descreveram um estudo onde a PHA foi administrada em ratos, e houve ligação desta a mucosa intestinal, resultando em lesões e desenvolvimento anormal das microvilosidades.

Por outro lado, em doses controladas, a PHA ao chegar ao intestino delgado se liga aos enterócitos, estimulando fatores de crescimento, aumentando o número

de células e o tamanho da cripta do intestino. Pelo fato de serem capazes de estimular a liberação de hormônios necessários para o bom funcionamento do trato gastrointestinal, quando ingeridas por via oral essas lectinas também podem ser utilizadas para o tratamento de doenças crônicas intestinais, como, por exemplo, a atrofia do intestino delgado que ocorre em pacientes que são alimentados por via parenteral e mucosites desencadeadas após o tratamento com quimio e/ou radioterapia (PUSZTAI et al., 2008).

Uma vez que o reconhecimento celular é o primeiro passo para interações célula-célula e que estas interações podem gerar eventos como defesa imune, migração celular, entre outros, a ideia de que carboidratos presentes na superfície das células podem auxiliar no reconhecimento celular estimulou a busca por novas lectinas, pois em um sentido mais amplo as lectinas podem funcionar como moléculas de reconhecimento no interior e na superfície das células (SHARON; LIS, 1989).

GONZALEZ DE MEJÍA e PRISECARU (2005) descreveram vários estudos relacionando lectinas e seu efeito inibitório no crescimento de tumores em diversas linhagens celulares, em testes *in vitro* e *in vivo*. Nestes estudos, a atividade antitumoral de algumas lectinas foi comprovada, e este efeito pode ser devido a uma remodelação do sistema imune, causando diminuição do tamanho do tumor e morte celular, entre outros eventos.

Algumas lectinas de cereais e leguminosas ao se ligarem aos enterócitos aumentam a permeabilidade intestinal, facilitando a passagem de bactérias e antígenos da dieta, sendo capazes de estimular células T (PUSZTAI et al., 2008). O estímulo constante de linfócitos T em indivíduos geneticamente suscetíveis pode acelerar o desenvolvimento de doenças crônicas, como é o caso da artrite reumatoide (CORDAIN et al., 2000). Este grupo de pesquisadores mostrou que as modificações geradas com o aumento de atividade do sistema imune e de bactérias do intestino, que culminam em aumento dos linfócitos T, podem ser reduzidas eliminando algumas lectinas da dieta, o que contribui para a diminuição dos sintomas em alguns pacientes com artrite reumatoide.

Como citado anteriormente, o consumo de grandes quantidades de algumas lectinas está associado com efeitos deletérios no organismo, começando no intestino delgado e podendo alcançar efeitos sistêmicos, entretanto, o consumo de

pequenas quantidades de lectinas, ou daquelas que são menos abundantes, demonstrou ter efeitos benéficos.

Do ponto de vista nutricional, é importante saber se um alimento contém lectinas que podem ser tóxicas após ingestão. Contudo, considerando que o consumo de pequenas quantidades de lectina pode ser benéfico, é importante investigar os efeitos daquelas que são menos abundantes, como é o caso de algumas lectinas presentes nos frutos, que são alimentos geralmente consumidos *in natura*. Essas informações podem ser de extrema importância para a saúde do consumidor e ampliar nosso entendimento sobre a relação entre a alimentação e saúde.

KILPATRICK et al. (1985) realizaram um estudo *in vivo* analisando o intestino de ratos e o sangue periférico de humanos que ingeriram a lectina de tomate. Os autores verificaram que essa lectina não foi tóxica para os ratos e assim como a maioria das lectinas, a de tomate também resiste à digestão no intestino de ratos. Ao contrário da PHA, que em doses controladas pode auxiliar na perda de peso, os ratos que ingeriram a lectina de tomate perderam menos peso quando comparados aos animais que ingeriram outro tipo de alimento sem ter sido suplementado com proteína.

Com base na tradição popular, em que se faz uso de goiaba (*Psidium guava)* em casos de diarreia, ou tamarindo (*Tamarindus indica*) em casos de constipação intestinal, COUTIÑO-RODRÍGUEZ et al. (2001) analisaram extratos de lectinas dessas e outras frutas, como, por exemplo, manga (*Mangifera indica*) e ameixa (*Spontia vulgaris)*, além de extratos de lectinas de leguminosas como o feijão (*Phaseolus* vulgaris) e a soja (*Glicina max*), que foram usados para testar sua participação na interação patógeno-hospedeiro. Como modelo de infecção, foi utilizada a cepa de *E. coli* 0157:H7, uma bactéria enterohemorrágica extremamente virulenta. Os resultados deste estudo mostraram que somente a lectina da goiaba foi capaz de aderir à *E. coli* 0157:H7, inibindo a interação patógeno-hospedeiro e, portanto, a infecção. De maneira oposta, a lectina de soja induziu ao processo de lise celular da bactéria podendo facilitar a sua ligação com a célula do hospedeiro.

1.2. BanLec

No início dos anos 80, GIBBONS e DANKERS (1981) relataram o forte efeito inibitório do extrato de banana na adesão do *Streptococcus mutans* em hidroxiapatita tratada com saliva, em um modelo mimetizando o dente humano. Embora estes autores não tenham isolado a molécula responsável por este efeito, eles sugeriram que o componente presente no extrato tinha características de uma lectina, pois apresentou atividade aglutinante.

De fato, a lectina presente na banana somente foi isolada e purificada, e recebeu o nome de BanLec, posteriormente, em trabalho de KOSHTE et al. (1990). Os autores estudavam o efeito da resposta imunológica frente a vários alimentos e perceberam que um componente presente no extrato de banana era capaz de estimular a produção de células T humanas. Devido à natureza mucilaginosa deste extrato, após passagem dos extratos de banana em coluna de Sephadex G-75, esta atividade foi removida e recuperada por eluição com manosídeo, demonstrando, portanto, tratar-se de uma lectina. A BanLec purificada neste estudo apresentou massa molecular de aproximadamente 27 kDa na sua forma nativa e de 13 KDa em condições desnaturantes, ponto isoelétrico de aproximadamente 7,3 e capacidade de aglutinar fortemente hemácias de coelho, mas não as de humanos ou de carneiro, sendo essa atividade inibida na presença de α-metil manosídeo, manose e glicose. Os autores conseguiram um rendimento de BanLec de 4 $\mu g.g^{-1}$ na polpa fresca e 7 $\mu g.g^{-1}$ na polpa seca dos frutos, o que constitui um baixo rendimento se comparado à con A extraída do feijão seco (26 $mg.g^{-1}$).

Os relatos existentes sobre as lectinas de banana já estudadas mostram algumas diferenças de acordo com a espécie estudada. Como anteriormente citado, a BanLec extraída de *Musa paradisiaca por* KOSHTE et al. (1990) apresentou 27 KDa com subunidades de aproximadamente 13 KDa, com especificidade de ligação para α-metil manosídeo, manose e glicose. A BanLec de *Musa acuminata* apresentou duas subunidades de 15 KDa (PEUMANS et al., 2000), ligação específica para manose e glicose (MO et al., 2001) e reconheceu ligações α-1,3 de resíduos internos de α-glicanos, assim como ligações β-1,3 de extremidades redutoras de oligossacarídeos (GOLDSTEIN et al*.,* 2001; MEAGHER et al., 2005) e extremidades glicosídicas β-1,6 de polissacarídeos (GOLDSTEIN et al., 2001). A lectina de banana da cultivar '*Emperor*' de *Musa basjoo*, assim como a lectina de *Musa acuminata*, é uma proteína dimérica com duas subunidades de 15 KDa e

ligação específica para manose e glicose (WONG; NG, 2006). A Figura 1 mostra a estrutura de BanLec de *Musa acuminata* deduzida a partir de análise cristalográfica, sendo possível constatar que essa lectina possui dois sítios de ligação a carboidratos em cada um dos seus monômeros (MEAGHER et al., 2005; SINGH et al., 2005).

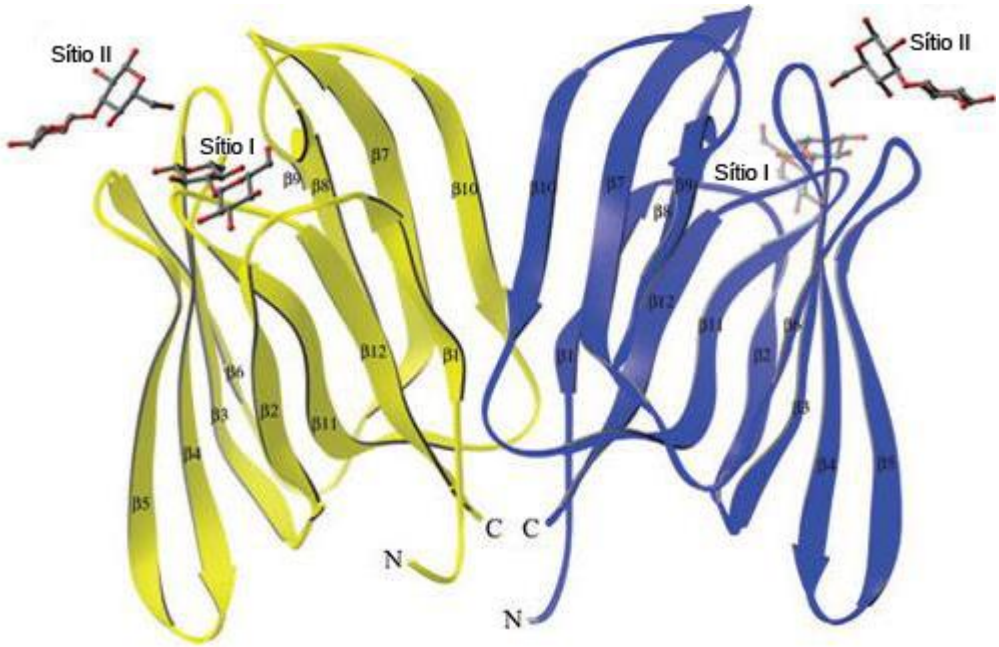

Figura 1. Estrutura tridimensional de Banlec de *Musa acuminata*, em que fitas de folha β antiparalelas estão representadas como flechas, conectadas por voltas reversas. No topo de cada monômero da proteína estão evidenciados os sítios de ligação a carboidratos (sítio I e sítio II). Adaptado de MEAGHER et al. (2005).

A BanLec pertence à família das lectinas similares à jacalina, e assim como essa última, está abundantemente presente na polpa de frutos frescos, não sendo encontradas em outras partes da planta. Porém, PEUMANS et al. (2000) conseguiram induzir a produção de BanLec nas folhas da bananeira após tratamento com metil-jasmonato, um hormônio que está normalmente relacionado com mecanismos de defesa da planta.

PEUMANS et al. (2000) também verificaram que BanLec de bananas de sobremesa (*Musa acuminata*) e plátano são resistentes até 70°C e estáveis a variações de pH na faixa de 2,5 a 12. As análises dos simulados de fluidos gástricos (SGF) e intestinais (SIF) contendo BanLec recombinante (rBanLec) produzida em *E.coli* (DIMITRIJEVIC et al., 2010) mostraram que esta proteína foi capaz de resistir à proteólise das enzimas pepsina e pancreatina, como revelado pelos tratamentos

durante 2 horas nos fluídos gástricos e por 1 hora nos intestinais. Neste estudo, a análise por calorimetria diferencial de varredura (DSC) revelou que após atingir 60,8°C, a rBanLec começou a sofrer degradação, mostrando que a forma recombinante da lectina de banana é discretamente mais sensível ao calor, quando comparados com os experimentos de PEUMANS et al. (2000) realizados com BanLec natural.

KOSHTE et al. (1992) verificaram que BanLec é capaz de induzir fortemente a IgG4 humana, que é a proteína menos abundante dentre as subclasses de IgG, sendo na clínica médica comum solicitar medição desta proteína no caso de suspeita de alergia alimentar. Porém, sua positividade ou aumento não significa alergia (ou intolerância), mas o nível de uma resposta fisiológica do sistema imune frente ao contato com os compostos presentes no alimento (STAPEL et al., 2008).

A BanLec também é considerada uma lectina com atividade imunomoduladora, uma vez que é capaz de induzir a proliferação de linfócitos T. Em um estudo realizado por PEUMANS et al. (2000), utilizando esplenócitos de camundongos das linhagens BALB/c e C57BL/6, em concentrações de aproximadamente 1 μg.mL-1, as lectinas das cultivares '*Grand Nain'* (BanLec), e *'False Horn'* (PlanLec), consideradas bananas de sobremesa e plátano respectivamente, foram capazes de estimular a proliferação de células T em esplenócitos de camundongos de ambas as linhagens.

Da mesma forma, a lectina da 'Emperor banana' (EBL), uma cultivar de *Musa basjoo* (WONG; NG, 2006) foi capaz de provocar atividade mitogênica em esplenócitos de camundongos da linhagem BALB/c em concentrações menores de 10 $\mu g.mL^{-1}$, que foi inibida quando glicose estava presente nos extratos. Por outro lado, em concentrações maiores do que 10 $\mu g.mL^{-1}$, a EBL mostrou não ser mitogênica, indicando haver uma relação dose-dependente destas proteínas e uma possível diferença na intensidade de resposta quando as cultivares são comparadas.

Pelo fato de existirem quantidades relativamente pequenas dessas proteínas na fruta *in natura* quando comparadas às lectinas de sementes e de inconsistências entre lotes quando extraídas de fontes naturais, um grupo de pesquisadores resolveu construir uma BanLec recombinante e testar suas características. O primeiro estudo foi de caracterização e comparação, utilizando BanLec natural (nBanLec), extraída de *Musa acuminata*, e BanLec recombinante (rBanLec),

produzida em *E.coli* (GAVROVIC-JANKULOVIC et al., 2008). Neste estudo os pesquisadores verificaram que ambas as lectinas tem características muito semelhantes, como massa molecular e sequência de aminoácidos. Porém, a nBanLec é uma proteína heterogênea, possuindo várias isoformas, enquanto que a rBanLec é uma proteína mais homogênea. Além disso, a rBanLec apresentou capacidade de ligação maior as células T quando comparada a nBanLec. Isto pode ser devido à microheterogeneidade no preparo e também é possível que algumas frações com atividade biológica de nBanLec tenham sido perdidas durante o processo de purificação. De qualquer forma, ambas as lectinas foram capazes de estimular a produção de linfócitos T, sendo a concentração mínima mitogênica de nBanLec e rBanlec de 0,2 $\mu g.mL^{-1}$, tendo como concentração ótima 2 $\mu g.mL^{-1}$. Corroborando os dados de WONG e NG (2006), a uma concentração de 10 $\mu g.mL^{-1}$ ambas as lectinas não mostraram atividade mitogênica.

Além da capacidade de induzir proliferação de linfócitos T, já relatada (KOSHTE et al., 1990; PEUMANS et al. 2000; WONG; NG, 2006), a adição de BanLec da cultivar 'Emperor' foi capaz de induzir a produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongos e inibir a atividade da transcriptase reversa do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1). Os autores comprovaram que esta lectina possui atividade antiproliferativa em células leucêmicas da linhagem L1210 em uma concentração de 0,25 $mg.mL^{-1}$, podendo ser usada como potencial terapêutico em doenças linfoproliferativas (WONG; NG, 2006). Após testes de indução de rBanLec por STOJANOVIC et al. (2010) em esplenócitos de camundongos, os autores observaram que esta lectina também foi capaz de induzir a produção de citocinas, como Interferon gama (IFN- γ), interleucinas (IL)-4 e 10. Efeitos similares também foram notados para a lectina da cultivar 'Del Monte' (DBL), que induziu a expressão de IFN-γ, Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-α) e IL-2 (CHEUNG et al., 2009).

Um dos componentes mais promissores na inibição da transmissão do HIV-1 via retal ou vaginal são os agentes que bloqueiam o vírus antes da integração com o genoma viral da célula alvo. SWANSON et al. (2010) relataram que BanLec foi capaz de se ligar ao envelope rico em manose do HIV-1 e, portanto, foi capaz de bloquear a infecção, além de reduzir a replicação do vírus, abrindo a perspectiva de que seus efeitos anti-virais possam servir de base para elaboração de formas farmacêuticas utilizadas como microbicida tópico.

Recentemente, DIMITRIJEVIC et al., (2012) analisaram os efeitos de rBanLec quando administrada via oral. Além disso, os autores analisaram, *in vivo,* a estabilidade e interação com células na superfície da mucosa do trato digestivo de camundongos, além de suas consequências imunológicas em termos de produção de anticorpos após administração oral. Neste estudo, foi possível observar que rBanLec interage especificamente com a superfície de mucosa do intestino de camundongos podendo ser utilizada como uma molécula estável e imunoestimulatória, sendo uma candidata a adjuvante do trato gastrointestinal. Os autores sugerem uma possível substituição da BanLec natural por esta forma recombinante, visto que os estudos iniciais mostraram que ela é segura para o consumo humano e animal. No entanto, ainda não foram feitos estudos em humanos com nenhuma das formas desta lectina.

Os dados existentes sobre BanLec sugerem que existem diferenças nos teores desta lectina dependendo do tipo de cultivar. Além disso, o estádio de maturação e métodos pós-colheita utilizados também parecem exercer algum tipo de influência nos teores de BanLec encontrados. Um estudo realizado por PEUMANS et al. (2002) com a cultivar '*Grand Nain',* mostrou que quando os frutos amadureceram ligados à planta o valor máximo de BanLec foi de 96 $\mu g.g^{-1}$, enquanto para bananas que amadureceram naturalmente depois de destacadas da planta o teor máximo foi de 24 $\mu g.g^{-1}$. Para bananas que foram destacadas da planta, mas induzidas a amadurecer com Ethephon, o valor máximo de BanLec foi superior a 70 $\mu g.g^{-1}$. Os autores do estudo especulam que é possível que a expressão da lectina de banana esteja sujeita ao controle de outros hormônios vegetais ou metabólitos, associados com a resposta ao stress biótico ou abiótico.

KOSHTE et al. (1990), embora não tenham estudado estes efeitos, sugeriram que é possível que existam diferentes teores de BanLec nos diferentes estádios de maturação. Mais tarde, CLENDENNEN e MAY (1997) identificaram um fragmento de um gene relacionado à lectina de banana em frutos da cultivar '*Grand Nain'*, que teve a expressão diminuída nas fases iniciais do amadurecimento, inclusive quando a fruta estava madura. A análise mostrou expressão desses transcritos na polpa do fruto e na raiz da planta. Embora a expressão de transcritos deste gene tenha sido encontrada inclusive nas raízes, a análise por Northern blotting não foi positiva para esses transcritos na casca do fruto.

No entanto, em desacordo com esses estudos, PEUMANS et al. (2002) relataram que a quantidade de BanLec aumentou progressivamente no fruto maduro. Em contraste com a polpa, não foi observado acúmulo de lectina na casca dos frutos, assim como não foram encontradas concentrações detectáveis de BanLec na polpa e na casca de frutos verdes. O tratamento com etileno exógeno realizado no estudo não somente acelerou o acúmulo, como também aumentou a quantidade de BanLec na polpa dos frutos tratados quando comparados ao controle sem tratamento. Além disso, plantas jovens tratadas com metil jasmonato exibiram forte indução da transcrição do gene de BanLec nas folhas (PEUMANS et al., 2000). CAAMAL-VELÁSQUEZ et al. (2007) encontraram genes semelhantes aos já descritos anteriormente por CLENDENNEN e MAY (1997), de provável BanLec na casca da banana, embora a análise por Northern blotting só tenha sido positiva para este gene na polpa de frutos submetidos à injúria pelo frio.

1.3. Cultivares de banana e manejo pós-colheita

A banana é uma monocotiledônea do gênero *Musa* (Musaceae), sendo uma das frutas mais consumidas no mundo em razão do conteúdo de vitaminas, minerais e sabor agradável. Embora a banana não tenha sua origem comprovada, os primeiros cultivos de bananeira datam de aproximadamente 7 mil anos atrás, no sudeste asiático (LI et al., 2013).

Existe mais de 1000 cultivares de banana identificados em todo o mundo, que de acordo com a classificação genômica, podem ser diploides, triplóides ou tetraploides, sendo a maioria dessas cultivares proveniente do cruzamento de *Musa acuminata* (doador do genoma A) e *Musa balbisiana* (doador do genoma B). Grande parte dessas bananas domesticadas é de origem triploide, podendo ser AAA, AAB ou ABB (HESLOP-HARRISON; SCHWARZACHER, 2007), sendo essas últimas geralmente consumidas após processamento térmico. No grupo de bananas de origem triplóide, destacam-se as bananas de sobremesa do subgrupo Cavendish, que são as mais consumidas mundialmente e são triploides AAA. No mercado nacional, esse grupo genômico corresponde a cultivar Nanica ou Nanicão, mas as cultivares mais consumidas no Brasil são do subgrupo prata, que são triploides AAB (EMBRAPA, 2009). As bananas que são geralmente consumidas após

processamento térmico (cozimento), nomeadas *plantain* ou plátano, em geral são AAB, ABB ou BBB (AURORE et al, 2013).

A banana é considerada um fruto climatérico (ROSSETO et al., 2004; WATKINS, 2006), ou seja, ela é capaz de produzir elementos necessários para o seu amadurecimento mesmo após ser destacada da planta-mãe. Diversas enzimas e hormônios estão envolvidos neste processo de amadurecimento, que irão auxiliar no desenvolvimento de características como cor, sabor e odor, que tornam o fruto desejável para o consumo (CLENDENNEN; MAY, 1997).

Aproximadamente um quinto da produção de banana no Brasil é perdido após a colheita, e em virtude dessas altas taxas de perda de produtividade, muitos procedimentos de manipulação e tecnologia são realizados nesta etapa com o objetivo de desacelerar o processo de senescência, que é o processo no qual ocorrem eventos que vão levar à morte do fruto (FENNEMA, 2007). A estocagem de bananas a baixas temperaturas é uma das medidas adotadas para aumentar o tempo de prateleira da banana para o consumidor, pois esse procedimento diminui a taxa respiratória do fruto, retardando o amadurecimento e mantendo o etileno em concentrações mais baixas possíveis (SEYMOUR et al, 1993).

Dentre os hormônios relacionados ao amadurecimento dos frutos, certamente o etileno é o que recebe mais atenção. Também chamado de “hormônio do amadurecimento”, ele é biologicamente ativo em quantidades mínimas e seus efeitos fisiológicos são extremamente importantes. O etileno pode ser liberado dentro e fora dos tecidos vegetais, e os efeitos causados aos frutos expostos a esse hormônio podem variar dependendo do fruto, do estádio de desenvolvimento em que ele se encontra, e qual objetivo da sua utilização (SALVEIT, 1999). Ele atua como hormônio vegetal e afeta muitos processos do desenvolvimento da planta como metabolismo celular, germinação de sementes, senescência de flores e folhas, crescimento e diferenciação de raízes e o amadurecimento de frutos. A aplicação de etileno exógeno em bananas no estádio pré-climatérico (verdes) induz a biossíntese autocatalítica desse hormônio, podendo acelerar o processo de degradação de amido e consequente conversão em açúcares solúveis (PURGATTO et al., 2002). O amido é a forma mais importante de polissacarídeos de reserva nas plantas. Na banana, ele é acumulado durante o desenvolvimento do fruto e rapidamente degradado durante o amadurecimento, iniciando a síntese de sacarose e açúcares solúveis (CORDENUNSI; LAJOLO, 1995).

Outro fator que não pode ser desconsiderado no amadurecimento de frutos é a taxa respiratória. Mesmo após serem destacados da planta-mãe, os frutos climatéricos continuam respirando, utilizando o oxigênio do ar e liberando gás carbônico. A energia necessária para realizar vários processos que serão fundamentais para o desenvolvimento do fruto e seu consequente amadurecimento, é retirada da respiração (FENNEMA, 2007). Portanto, pela redução do metabolismo respiratório de um fruto é possível aumentar a sua vida útil ou 'vida verde'.

Visando melhorar a qualidade dos frutos, dentre as técnicas utilizadas estão a aplicação de inibidores de etileno, como exemplo, o 1-Metilciclopropeno (1-MCP) e o armazenamento a baixas temperaturas com atmosfera modificada ou controlada que leva a diminuição da atividade enzimática (BHANDE et al., 2008). Ambas promovem o retardo no amadurecimento, permitindo estender a vida útil de prateleira e assim, o prazo de comercialização dos frutos (WATKINS, 2006).

Entretanto, esses métodos pós-colheita utilizados podem afetar a qualidade do fruto tornando-o mais ou menos atrativo, dependendo do tipo de tratamento utilizado. Em um trabalho realizado com bananas da cultivar Nanicão tratadas com etileno exógeno e 1-MCP foi possível observar um aumento significativo da atividade da amido fosforilase, uma enzima ligada a degradação de amido em bananas, sendo que o etileno exógeno não afetou os níveis de atividade dessa enzima (MAINARDI et al, 2006). Por outro lado, o armazenamento de frutos de banana a baixas temperaturas pode ocasionar injúrias ao fruto que são indesejáveis comercialmente. CAAMAL-VELÁSQUEZ et al. (2007) observaram que os primeiros sinais de injúria em bananas da cultivar *Grand Nain* do grupo genômico AAA apareceram no fruto após 8 horas de exposição ao tratamento com baixa temperatura. Do mesmo modo, DER AGOPIAN et al. (2011) demonstraram que frutos da cultivar Nanicão (grupo genômico AAA, muito semelhante à cultivar *Grand Nain*) sofreram injúrias quando submetidas ao tratamento baixas temperaturas, fato que não foi observado para a cultivar Prata, cujo grupo genômico é AAB. A presença do genótipo B pode ser um indicativo de resistência ao tratamento com baixas temperaturas, conforme descrito por LICHTEMBERG et al., (2001).

Além disso, frutos da banana Nanicão submetidos a baixas temperaturas de armazenamento apresentaram ausência de sabor e odor característicos da banana (DER AGOPIAN et al., 2011), fato posteriormente comprovado por FACUNDO et al. (2012) que relataram uma perda de compostos voláteis bem mais significativa na

cultivar Nanicão do que na Prata. Também foi observado em frutos da cultivar Nanicão atraso na degradação de amido associado ao aumento da quantidade de amido residual após o amadurecimento de frutos, o que resultou em aproximadamente metade da quantidade de açúcares solúveis que normalmente estariam presentes no fruto maduro (PERONI-OKITA et al., 2013). Com base nesses estudos é possível afirmar que o armazenamento de bananas a baixas temperaturas, embora seja um método utilizado principalmente para transporte a longas distâncias, afeta as características sensoriais do fruto, principalmente de bananas da cultivar Nanicão. Essa é uma característica comercialmente indesejável, pois cor, aroma e sabor são atrativos essenciais para o consumo de frutos.

Uma vez que os tratamentos pós-colheita podem causar estresse ao fruto e modular a expressão de alguns genes (KESARI et al., 2007), é razoável pensar que possa haver diferenças na quantidade de lectinas presentes nos frutos depois da colheita, uma vez que já foi proposto que a síntese dessas proteínas está associada a fatores de resposta ao estresse biótico ou abiótico da planta, como é o caso da lectina presente na polpa de bananas (PEUMANS et al., 2000).

Também pode ser relevante investigar a presença de BanLec em produtos derivados de banana, Nesse caso, merece destaque a farinha de banana verde, que é um produto que permite aproveitar excedentes dos frutos e resulta em um produto que tem grande aceitação no mercado, pois seu consumo pode influenciar positivamente na saúde humana, em razão do alto teor de amido resistente e açúcares solúveis (MENEZES et al., 2011). Em consequência de sua capacidade de se ligar a carboidratos, em especial daqueles que tem glicose, é possível que BanLec se ligue às cadeias do amido e resista ao tratamento térmico realizado na preparação deste produto, promovendo, portanto, uma concentração desta lectina na farinha de banana verde. Além disso, como se trata de um produto desidratado e com grandes quantidades de amido, os níveis de exposição à BanLec pelo consumo da farinha podem ser maiores que o da fruta *in natura*, em consequência do processo de secagem.

1.4. Objetivos do estudo

Todos estes relatos sobre os efeitos imunomoduladores de BanLec e outras lectinas indicam que os efeitos observados são dose-dependentes. Além disso,

ainda que discretas, parecem existir diferenças nos efeitos observados para diversas cultivares de banana, ainda que isso não tenha sido estudado especificamente. Os estudos feitos até o momento com as diferentes cultivares de banana também apontam para variação nos teores desta lectina, que pode estar relacionado com o estádio de maturação do fruto. Recentemente, foi constatado que BanLec pode chegar ao intestino interagir com esse órgão, oferecendo a possibilidade de promover efeitos sistêmicos. Assim, é possível que o consumo de bananas possa desencadear os efeitos imunomoduladores, sendo interessante conhecer os teores de BanLec existentes nas cultivares que são consumidas pela nossa população, além da possível influência que os tratamentos pós-colheita efetuados nos frutos possam exercer sobre os teores dessa proteína. Dessa forma, pode ser de grande relevância saber que efeitos podem ser observados após a ingestão de BanLec extraída de fontes naturais, e identificar quantidades de BanLec que possam estar associados aos efeitos sobre o sistema imune.

1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AURORE, G.; PARFAIT, B.; FAHRASMANE, L. Bananas, raw materials for making processed food products. **Trends in Food Science & Technology,** pp. 1-13, 2008.

ALBORÉS, S.; MORA, P.; BUSTAMANTE, M.J.; CERDEIRAS, M.P.; FRAGUAS, L.F. Purification and applications of a lectin from the mushroom *Gymnopilus spectabilis*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, vol. 172, pp. 2081–2090, 2014.

BHANDE, S.D.; RAVINDRA, M.R.; GOSWAMI, T.R. Respiration rate of banana fruit under aerobic conditions at different storage temperatures. **Journal of Food Engineering**, vol. 87, pp. 116–123, 2008.

BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, vol. 26, pp. 119-419, 1954.

CAAMAL-VELÁSQUEZ, J.H.; CHI-MANZANERO, B.H.; CANCHE-YAM, J.J.; CASTAÑO, E.; RODRIGUÉZ-ZAPATA, L.C. Low temperature induce differential expression genes in banana fruits. **Scientia Horticulturae**, vol. 114, pp. 83-89, 2007.

CHAPMAN, M.D. et al. Recombinant allergens for diagnosis and therapy of allergic disease. **J. Allergy Clin. Immunol**.,vol. 106, pp. 409-418, 2000.

CHEUNG, A.H.K.; WONG, J.H.; NG, T.B. Musa acuminata (Del Monte banana) lectin is a fructose-binding lectin with cytokine-inducing activity. **International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology**, vol. 16, nº 6-7, pp. 594-600, 2009.

CLENDENNEN, S.K.; MAY, C.D. Differential gene expression in ripening banana fruit. **Plant Physiol.**, vol. 11, nº 5, pp. 463-469, 1997.

CORDAIN, L.; TOOHEY, L.; SMITH, M.J.; HICKEY, M.S. Modulation of immune function by dietary lectins in rheumatoid arthritis. **British Journal of Nutrition**, vol. 83, pp. 207–217, 2000.

CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M. Starch breakdown during banana ripening: Sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. **J. Agric. Food. Chem**., vol. 43, pp. 347-351, 1995.

COUTIÑO-RODRÍGUEZ, R.; HERNÁNDEZ-CRUZ, P.; GILES-RÍOS, H. Lectins in Fruits Having Gastrointestinal Activity: Their Participation in the Hemagglutinating Property of Escherichia coli 0157:H7. **Archives of Medical Research**, vol. 32, pp. 251–257, 2001.

DANGUY, A.; CAMBY, I.; KISS, R. Galectins and cancer, **Biochim. Biophys. Acta**, vol. 1572, pp. 285–293, 2002.

DER AGOPIAN, R.G. et al., Low temperature induced changes in activity and protein levels of the enzymes associated to conversion of starch to sucrose in banana fruit. **Postharvest Biology and Technology**, vol. 62, pp. 133–140, 2011.

DIMITRIJEVIC, R.; JADRANIN, M.; BURAZER, L.; OSTOJIC, S.; GAVROVIC-JANKULOVIC, M. Evaluation of the thermal stability and digestibility of heterologously produced banana lectin. **Food Chemistry**, vol. 120, pp. 1113-1118, 2010.

DIMITRIJEVIC, R.; STOJANOVIC, M.; MICIC, M.; DIMITRIJEVIC, LJ.; GAVROVIC-JANKULOVIC, M.. Recombinant banana lectin as mucosal immunostimulator. **Journal of functional foods**, vol. 4, pp. 636-641, 2012.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2009. Sistema de produção da bananeira irrigada. Disponível em:

http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananeiraIrrigada/cultivares.htm Acesso em: 05 jun. 2014.

FACUNDO, H.V.V.; GARRUTI, D.S.; DIAS, C.T.S.; CORDENUNSI, B.R.; LAJOLO, F.M. Influence of different banana cultivars on volatile compounds during ripening in cold storage. **Food Research International**, vol. 49, pp. 626–633, 2012.

FENNEMA, O.C. **Fennema´s Food Chemistry**. 4ª Ed. Marcel Dekker, New York, 2007.

FREED, D.L.J.. Lectins. **British Medical Journal**, vol. 290, pp. 584-585, 1985.

GAVROVIC-JANKULOVIC, M. et al. A novel recombinantly produced banana lectin isoform is a valuable tool for glycoproteomics and a potent modulator of the proliferation response in CD3+, CD4+, and CD8+ populations of human PBMCs. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, vol. 40, pp. 929–941, 2008.

GIBBONS, R.J.; DANKERS, I. Lectin-Like Constituents of Foods Which React with Components of Serum, Saliva, and *Streptococcus mutans*. **Applied and Environmental Microbiology,** Apr, pp. 880-888, 1981.

GOLDSTEIN, I.J. Lectin structure-activity: The story is never over. **J. Agric. Food Chem.**, vol. 50, pp. 6583-6585, 2002.

GOLDSTEIN, I.J. et al. Carbohydrate binding properties of banana (Musa acuminata) lectin II. Binding of laminaribiose oligosaccharides and β-glucans containing β1,6-glucosyl end groups. **Eur. J. Biochem**., vol. 268, pp. 2616-2619, 2001.

GONZALEZ DE MEJÍA, E.; PRISECARU, V.I. Lectins as bioactive plant proteins: A potential in Cancer treatment. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, vol. 45, pp. 425-445, 2005.

HABIBI, J.; BACKUS, E.A.; HUESING, J.E. Effects of phytohemagglutinin (PHA) on the structure of midgut epithelial cells and localization of its binding sites in western tarnished plant bug, *Lygus hesperus* Knight. **J. Insect Physiol**., vol. 46, pp. 611-619, 2000.

HESLOP-HARRISON, J.; SCHWARZACHER, T. Domestication, genomics and the future for banana. **Annals of Botany**, vol. 100, pp. 1073–1084, 2007.

KESARI, R.; TRIVEDI, P.K.; NATH, P. Ethylene-induced ripening in banana evokes expression of defense and stress related genes in fruit tissue. **Postharvest Biology and Technology**, vol. 46, pp. 136–143, 2007.

KILPATRICK, D.C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1572, pp. 187-197. 2002.

KILPATRICK, D.C.; PUSZTAI, A.; GRANT, G.; GRAHAM, C.; EWEN, S.W.B. Tomato lectin resists digestion in the mammalian alimentary canal and binds to intestinal villi without deleterious effects. **FEBS**, vol. 185, nº 2, pp. 299-305, 1985.

KOSHTE, V.L.; AALBERS, M.; CALKHOVEN, P.G.; AALBERSE, R.C. The potent IgG4-inducing antigen in banana is a mannose-binding lectin, BanLec-I. **Int. Arch. Allergy Immunol.** vol. 97, nº 1, pp. 17–24, 1992.

KOSHTE, V.L.; VAN DIJK, W.; VAN DER STELT, M.E.; AALBERSE, R.C. Isolation and characterization of BanLec-I, a mannoside-binding lectin from Musa paradisiac (banana). **Biochem. J**., vol. 272, pp. 721-726, 1990.

LI, L. et al. Origins and domestication of cultivated banana inferred from chloroplast and nuclear genes. **PLOS one**, vol. 8, nº 11, pp. 1-11, 2013.

LICHTEMBERG, L.A.; MALBURG, J.L.; HINZ, R.H. Suscetibilidade varietal de frutos de bananeira ao frio. **Rev. Bras. Frutic.**,vol. 23, nº 3, pp. 568-572, 2001.

LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1572, pp. 198-208, 2002.

LORIS, R.; HAMELRYCK, T.; BOUCKAERT, J.; WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochim. Biophys. Acta**, vol. 1383, pp. 9-36, 1998.

MAINARDI, J.A. et al. Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene (1-MCP) on gene expression and activity profile of α-1,4-glucan-phosphorylase during banana ripening. **J. Agric. Food Chem.**, vol. 54, pp. 7294-7299, 2006.

MEAGHER, J.L.; WINTER, H.C.; EZELL, P.; GOLDSTEIN, I.J.; STUCKEY, J.A. Crystal structure of banana lectin reveals a novel second sugar binding site. **Glycobiology**, vol. 15, nº 10, pp. 1033-1042, 2005.

MENEZES, E.W. et al. Chemical composition and nutritional value of unripe banana flour (*Musa acuminata*, var. Nanicão). **Plant Foods Hum. Nutr.**,vol. 66, pp. 231–237, 2011.

MO, H. et al. Carbohydrate binding properties of banana (Musa acuminata) lectin I. Novel recognition of internal α1,3-linked glucosyl residues. **Eur. J. Biochem**., vol. 268, pp. 2609-2615, 2001.

NASI, A.; PICARIELLO, G.; FERRANTI, P. Proteomic approaches to study structure, functions and toxicity of legume seeds lectins. Perspectives for the assessment of food quality and safety. **Journal of Proteomics**, vol. 72, pp. 527–538, 2009.

PANUNTO-CASTELO, A.; SOUZA, M.A.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; SILVA, J.S. KM (+), a lectim from Artocarpus integrifolia, induces IL-12p40 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**, vol. 11, nº 12, pp. 1035-1042, 2001.

PERONI-OKITA, F.H.G. et al. The cold storage of green bananas affects the starch degradation during ripening at higher temperature. **Carbohydrate Polymers**, vol. 96, pp. 137– 147, 2013.

PEUMANS, W.J.; PROOST, P.; SWENNEN, R.L.; VAN DAMME, E.J.M. The abundant class III chitinase homolog in young developing banana fruits behaves as a transient vegetative storage protein and most probably serves as an important supply of amino acids for the synthesis of ripening-associated proteins. **Plant Physiol.**,vol. 130, pp. 1063-1072, 2002.

PEUMANS, W.J.; ZHANG W. et al. Fruit-specific lectin from banana and plantain. **Planta**, vol. 211, pp. 546-554, 2000.

PURGATTO, E.; NASCIMENTO, J.R.O; LAJOLO, F.M.; CORDENUNSI, B.R. The onset of starch degradation during banana ripening is concomitant to changes in the content of free and conjugated forms of indole-3-acetic acid. **J. Plant Physiol.**, vol. 159, pp. 1105-1111, 2002.

PUSZTAI, A. Dietary lectins are metabolic signals for the gut and modulate immune and hormonal functions. **Eur. J. Clin. Nutr.**, vol. 47, pp. 691-699, 1993.

PUSZTAI, A.; BARDOCZ, S. Biological effects of plant lectins on the gastrointestinal tract: Metabolic consequences and applications. **Trends Glycosci. Glycotechnol.**,vol. 8, pp. 149-165, 1996.

PUSZTAI, A.; BARDOCZ, S. EWEN, S.W.E. Uses of plant lectins in bioscience and biomedicine. **Frontiers in Bioscience**, vol. 13, pp. 1130-1140, 2008.

ROSSETO, M.R.M.; LAJOLO, F.M.; CORDENUNSI, B.R. Influência do ácido giberélico na degradação do amido durante o amadurecimento da banana. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, vol. 24, nº 1, pp. 76-81, 2004.

RÜDIGER, H.; GABIUS, H-J. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate Journal**, vol. 18, pp. 589–613, 2001.

SEYMOUR, G.; TAYLOR, J.; TUCKER, G. **Biochemistry of Fruit Ripening**. London: Chapman & Hall, 1993.

SALVEIT, M. Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, vol. 15, nº 3, pp. 279-292, 1999.

SHARON, N. Lectins: past, present and future. Biochemical Society **Transactions**, vol. 36, n° 6, pp. 1457-1460, 2008.

SHARON, N.; LIS, H. Lectin as cell recognition molecules. **Science**, vol. 246, pp. 227-234, 1989.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, vol 14, nº 11, pp. 53-62, 2004.

SILVA, H.C. et al. Purification and primary structure of a mannose/glucose-binding lectin from *Parkia biglobosa* Jacq. seeds with antinociceptive and anti-inflammatory properties. **J. Mol. Recognit**., vol. 26, pp. 470–478, 2013.

SINGH, D.D. et al. Unusual sugar specificity of banana lectin from Musa paradisiaca and its probable evolutionary origin. Crystallographic and modelling studies. **Glycobiology**, vol. 15, nº 10, pp. 1025-1032, 2005.

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. **Glycoconj. J.**, vol. 30, pp. 641-657, 2013.

STAPEL, S.O. et al. Testing for IgG4 against foods is not recommended as a diagnostic tool: EAACI Task Force Report. **Allergy**, vol. 63, pp. 793–796, 2008.

SUMNER, J.B.; HOWELL, S.F. The identification of the hemagglutinin of the Jack bean with Concanavalin A. **Journal of Bacteriology**, vol. 32, nº 2, pp. 227-237, 1936.

SWANSON, M.D.; WINTER, H.C.; GOLDSTEIN, I.J.; MARKOVITZ D.M. A lectin isolated from bananas is a potent inhibitor of HIV replication. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 285, nº 12, pp. 8646–8655, 2010.

VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, J.T.A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**., vol. 44, pp. 385-403, 2004.

WANG, H.; GAO, J.; NG, T.B. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the Oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 275, nº 3, pp. 810-816, 2000.

WATKINS, C.B. The use of 1-methylcyclopropene (1-MCP) on fruits and vegetables. **Biotechnology Advances**, vol. 24, pp.389–409, 2006.

WONG, J.H.; NG, T.B. Isolation and characterization of a glucose/mannose-specific lectin with stimulatory effect on nitric oxide production by macrophages from the emperor banana. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, vol. 38, pp. 234-243, 2006.

CAPÍTULO II

EFEITO DAS CULTIVARES E ESTÁDIO DE MATURAÇÃO NOS PERFIS DE BANLEC

2.1. RESUMO

BanLec é a lectina presente na polpa de bananas que tem especificidade de ligação à manose e glicose. Existem indícios de que os teores de BanLec podem mudar dependendo da cultivar analisada e do estádio de maturação, o que pode afetar a quantidade de BanLec existente na fruta quando consumida *in natura* e a possível resposta imune frente ao consumo de banana. No Brasil, as cultivares Pacovan, Mysore e Terra estão entre as cultivares mais consumidas, sendo a cultivar Nanicão destinada principalmente para exportação e industrialização. Por este motivo, o objetivo deste trabalho foi determinar os teores e a atividade hemaglutinante de BanLec em extratos de farinha de banana verde, além de bananas das cultivares Pacovan, Figo, Terra, Mysore e Nanicão, nos estádios de maturação verde e maduro, e submetidas a tratamento com 1-MCP e armazenamento em baixa temperatura (para cv. Nanicão). Foram realizados ensaios de hemaglutinação, obtidos perfis eletroforéticos e western blotting com anticorpo específico anti-BanLec para todas as cultivares, nos estádios de maturação verde e maduro, além de tentativa de quantificação de BanLec por ELISA. Os ensaios de atividade hemaglutinante apontaram para quantidade maior de BanLec no fruto maduro, e a ausência dessa proteína na banana Figo, uma das cultivares testadas. Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que existem diferenças expressivas nos teores de BanLec dependendo da cultivar e do estádio de maturação analisado.

2.2. INTRODUÇÃO

A lectina presente na polpa de bananas, denominada BanLec, foi isolada pela primeira vez de *Musa paradisíaca*, por KOSHTE et al. (1990). Nesse mesmo estudo, os autores relataram diferenças nos teores de lectina que foram relacionadas com a cultivar analisada (10 μg/g de BanLec na polpa de uma cultivar de sobremesa *versus* 50 μg/g na polpa de uma cultivar de cozinhar). As diferenças nos teores de BanLec também parecem estar relacionados ao estádio de maturação, embora existam na literatura relatos aparentemente contraditórios, pois os teores de BanLec estiveram aumentados em bananas que amadureceram na planta e após indução com etileno exógeno, como descrito por PEUMANS et al., (2002), enquanto CLENDENNEN e MAY (1997) identificaram um fragmento de um gene relacionado à lectina de banana em frutos da cultivar '*Grand Nain'* que teve a expressão diminuída nas fases iniciais do amadurecimento, inclusive quando a fruta estava madura.

Conforme apresentado, os dados sobre a ocorrência de BanLec e sua distribuição em tecidos da bananeira são conflitantes, além disso, o conjunto de resultados sugere que seus níveis podem ser afetados por condições ambientais ou depender da cultivar. Portanto, o objetivo deste trabalho foi determinar os teores e a atividade biológica de BanLec em frutas de diferentes cultivares, sob diferentes condições pós-colheita, e também em farinha derivada de frutas verdes. Para isso, foram estudadas amostras de bananas das cultivares Pacovan, Figo, Terra, Mysore e Nanicão, nos estádios de maturação verde e maduro, além de bananas submetidas a tratamento com 1-MCP e armazenamento em baixa temperatura para a cultivar Nanicão. Os resultados obtidos com esses experimentos nos forneceram informações necessárias para selecionar a cultivar cuja BanLec foi purificada e utilizada nos ensaios *in vivo*, apresentados no Capítulo III.

2.3. MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1. Material

2.3.1.1. Banana

Nessa etapa do estudo foram utilizadas amostras de farinha de banana verde (cv. Nanicão), amostras de banana das cultivares Pacovan, Mysore, Terra e Figo, provenientes do estudo de SOARES (2009) e amostras de banana da cultivar Nanicão (Tabela 2.1), provenientes do estudo de PERONI (2007), que foram submetidas a armazenamento em baixa temperatura (1) e tratamento com 1-Metilciclopropeno (MCP) (2), descritos a seguir:

1) Os frutos submetidos ao armazenamento em baixa temperatura foram contidos a 13ºC por 17 dias, quando a temperatura do armazenamento foi aumentada para 18ºC até o completo amadurecimento. Os frutos do grupo controle foram submetidos ao armazenamento em estufa incubadora refrigerada do tipo BOD (*Biochemical oxygen demand*) com temperatura de 20ºC ± 2 e umidade 75% ± 5.

2) Os frutos submetidos ao tratamento com 1-MCP foram hermeticamente fechados em uma caixa de polietileno contendo 100 nL/L (100 ppb) de 1-MCP (Ethylbloc, Rhom e Haas, Co). A liberação do gás foi feita pela adição de água ao 1-MCP sólido contido num béquer no interior da caixa. Após 12 horas de tratamento (conforme instruções do fabricante), os frutos foram armazenados em estufa incubadora refrigerada tipo BOD com temperatura de 20ºC ± 2 e umidade 75% ± 5. Os frutos do grupo controle foram tratados como descrito acima.

Para cada cultivar foram definidos dois grupos de estudo: o primeiro grupo foi considerado representativo de frutas verdes e o segundo de frutas maduras com base em determinações de amido e açúcares solúveis e medidas de respiração e etileno endógeno realizados por cromatografia gasosa (PERONI, 2007; SOARES, 2009). As amostras foram trituradas em presença de nitrogênio líquido e armazenadas a -80ºC para posterior análise.

Tabela 1. Cultivares de banana e respectivos subgrupos e grupos genômicos.

Cultivar	Subgrupo	Grupo genômico
Figo	Figo	ABB
Mysore	---	AAB
Nanicão	Cavendish	AAA
Pacovan	Prata	AAB
Terra	Plátano	AAB

2.3.1.2. Sangue de coelho

O sangue de coelho utilizado foi obtido de dois fornecedores: Costa e Melo Produtos Agrocupecuários Ltda (intitulado Fornecedor A) e Granja dos Ipês Ltda (intitulado Fornecedor B).

2.3.2. Métodos

2.3.2.1. Extração de proteínas de banana com 1,3-diaminopropano

Para os ensaios de hemaglutinação e posteriormente purificação de BanLec, as proteínas de banana foram extraídas de acordo com PEUMANS et al. (2002). Um grama de polpa foi triturado em presença de nitrogênio líquido e homogeneizado em 6 mL de uma solução 20 mM 1,3-diaminopropano. Os homogenatos foram transferidos para tubos de 2 mL e centrifugados a 12000 g por 10 minutos a 4ºC e o sobrenadante considerado o extrato de banana, o qual foi utilizado para medida da atividade hemaglutinante.

2.3.2.2. Extração de proteínas de banana com fenol

O segundo método de extração utilizado foi baseado no protocolo descrito por CARPENTIER et al. (2005). Um grama de polpa previamente triturado em presença de nitrogênio líquido foi pesado em um tubo com tampa de borracha e dispersado em 5 mL de tampão de extração (50 mM Tris-HCl pH 8,5, 5 mM, 100 mM KCl, sacarose 30% e DTT 1%) gelado. A mistura foi agitada por 30 segundos, e em seguida foram acrescentados 5 mL de fenol tamponado com Tris (pH 8,0) gelado. Os tubos foram deixados em agitação por 15 minutos a 4°C e posteriormente centrifugados a 6000g por 15 minutos a 4°C.

A fase orgânica contendo as proteínas foi coletada e transferida para um segundo tubo. Foi realizada uma re-extração dessa fase, adicionando-se 5 mL de tampão de extração e repetindo os passos acima até que a fase orgânica fosse novamente coletada, em um terceiro tubo.

O material foi precipitado por, no mínimo, 16 horas, por adição de 5 volumes (aproximadamente 25 mL) de solução de acetato de amônio 100mM em

metanol a -20 °C. O material precipitado foi centrifugado a 16000 g por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o tubo contendo o precipitado foi cuidadosamente lavado com 3 mL de solução de acetona gelada/DTT 0,2%. O material foi deixado secar ao ar por 30 minutos e após adicionar 1 mL de tampão de ressuspensão (7 M Uréia, 2 M Tiouréia, CHAPS 4% e DTT 1%), o material foi submetido à agitação por 1 hora à temperatura ambiente. Posteriormente o material foi transferido para um microtubo e centrifugado a 11000 g por 30 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi recolhido e armazenado a -20°C.

2.3.2.3. Extração de proteínas de feijão

As proteínas de feijão foram extraídas de acordo com GENOVESE e LAJOLO (2001). Foram adicionados 50 mL de solução hidróxido de sódio 0,01 N em 1 g de farinha de feijão cru, que foi obtida através de moagem das sementes de feijão em moinho Janke & Kunkel, e deixado em agitação por 3 horas. Após este tempo, a suspensão foi centrifugada a 11000 g por 20 minutos a 4ºC e o sobrenadante dessa etapa foi considerado o extrato de feijão, o qual foi utilizado como controle positivo no teste de atividade hemaglutinante.

2.3.2.4. Separação das hemácias do sangue de coelho

As amostras de sangue de coelho foram colhidas em tubos contendo solução de Alsever (LOWE et al., 1973)**,** que é o anticoagulante geralmente utilizado quando o objetivo final é a preservação das hemácias. A proporção do anticoagulante foi de 1:1, ou seja, uma parte de solução de Alsever para uma parte de sangue total. O sangue de coelho contendo anticoagulante foi encaminhado para o nosso laboratório refrigerado (2 a 8°C), para evitar hemólise e deterioração precoce do material.

Após o recebimento do sangue de coelho no laboratório, as amostras foram imediatamente submetidas ao processo de separação das hemácias por centrifugação e lavagem com solução de cloreto de sódio 0,9%. Rapidamente, em um tubo de polipropileno de 15 mL, foram adicionados 10 mL de solução de cloreto de sódio 0,9% em 5 mL de sangue total de coelho e este material foi centrifugado a 150 g por 15 minutos a 4ºC. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado com o

auxílio de pipeta e descartado, sendo que este processo de lavagem foi repetido por três vezes. Na última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o material sedimentado foi mantido a 4°C até o uso.

2.3.2.5. Tripsinização das hemácias

A tripsinização de hemácias foi feita conforme relatado por PEUMANS et al. (1997). As hemácias que foram reservadas na etapa acima foram incubadas com tripsina de pâncreas suíno 1% (Sigma-Aldrich) em banho-maria a 37ºC por 1 hora. Em seguida, o material foi lavado duas vezes com solução de cloreto de sódio 0,9% e as hemácias foram reconstituídas em volume suficiente para resultar em uma solução 2% sendo posteriormente utilizadas no ensaio de hemaglutinação.

2.3.2.6. Ensaio de hemaglutinação

O ensaio para análise da atividade hemaglutinante foi realizado em duplicata, em uma placa de microtitulação com poço de fundo côncavo em volume final de 50μL. Foram realizadas diluições seriadas em 1,3-diaminopropano 20 mM dos extratos de feijão e banana na proporção de 1:2 e cada poço recebeu uma destas diluições, sendo o poço de número 1 correspondendo ao extrato puro, o de número 2 à diluição 1:2, o de número 3 à diluição 1:4 e assim sucessivamente, até a diluição 1:1024 (poço 11). Para algumas amostras, a diluição efetuada seguiu até 1:2048.

Em cada poço foram adicionados 10μL de extrato, 20μL de sulfato de amônio 1M e 20μL de suspensão de hemácias de coelho a 2% previamente tripsinizadas.

A leitura do ensaio foi realizada visualmente, uma hora após a incubação a temperatura ambiente. O título de hemaglutinação foi definido como o recíproco da maior diluição em que se observou aglutinação (WONG; NG, 2003).

2.3.2.7. SDS-PAGE

As proteínas dos extratos de banana foram separadas por SDS-PAGE em géis a 15% de acrilamida/bisacrilamida, preparados de acordo com SAMBROOK et al. (1989). As proteínas dos extratos foram desnaturadas por adição de β-mercaptoetanol 5% e incubação em banho fervente por 5 minutos. O tamanho das proteínas foi estimado utilizando um padrão com bandas na faixa de 10 a 200 KDa (Page Ruler Unstained Protein Ladder - Fermentas). Os géis foram preparados em duplicata, sendo que em cada poço foram colocados 8 μg de proteína de cada extrato analisado. Para realizar a quantificação das proteínas totais foi utilizado o 2D Quant-Kit (GE Healthcare Life Sciences) de acordo com as instruções do fabricante.

A corrida foi realizada sob voltagem constante (200 V) por 45 minutos a 4°C. Após a corrida, um dos géis foi colocado em solução para posterior coloração com o reagente azul de coomassie e o outro foi reservado para realização de western blotting.

2.3.2.8. Coloração dos géis de poliacrilamida

Os géis foram corados por incubação em solução corante de azul de Coomassie G250 0,025% em ácido acético 10% por, no mínimo, 2 horas, de acordo com (WESTERMEIER, 2006). Após este período, foram descorados por incubação, sob agitação, em solução de etanol 5% e ácido acético 7,5%. A solução foi trocada a cada 15 minutos, até atingir o contraste desejado.

2.3.2.9. Western blotting

Após a eletroforese, os géis que não foram corados com azul de coomassie tiveram as proteínas transferidas para membrana de nitrocelulose (Hybond ECL 0,45μm – Amersham Biosciences) em tampão Tris/Glicina (pH 8,3)/Metanol 20%, a voltagem constante de 100V por 1 hora a 4°C no aparato de transferência Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad).

Após a transferência das proteínas, a membrana foi bloqueada com tampão 50 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; Tween 20 0,02% (Tampão TBS-T) adicionado de leite em pó desnatado a 5%, por 90 minutos de incubação a 4oC. Após o bloqueio, as proteínas foram incubadas nessa temperatura com o anticorpo

específico anti-BanLec de coelho (gentilmente cedido pela Profª Marija Gavrovic-Jankulovic, Faculdade de Química, Universidade de Belgrado, Sérvia) a diluição de 1:2000, em TBS-T adicionado de leite em pó desnatado 5% por 2 horas. Na sequência, foram feitas três lavagens com TBS por 10 minutos, e então as membranas foram incubadas com o anticorpo secundário IgG anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina a diluição de 1:30000 (Sigma Aldrich) em TBS-T + leite em pó desnatado 5% por 1 hora. Após três lavagens com TBS por 10 minutos, as membranas foram reveladas utilizando o substrato cromogênico NBT/BCIP de acordo com SAMBROOK et al. (1989) até atingir a coloração desejada.

2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1. Ensaios de hemaglutinação

A extração de BanLec utilizando 1,3-diaminopropano é um método relativamente simples e rápido de ser realizado. A escolha do reagente se deve ao fato dessas proteínas permanecerem inativadas reversivelmente em pH elevado com isso evitando a possível ligação com carboidratos presentes no extrato. Acrescentando-se uma solução de sulfato de amônio ao meio, o pH é reduzido, e as lectinas recuperam sua conformação nativa e atividade. Esta metodologia de extração foi importante para a realização dos testes de hemaglutinação para a BanLec, e posteriormente, para a purificação dessa proteína. KOSHTE et al. (1990) demostraram que a BanLec não aglutina hemácias de carneiro ou de humanos, mas aglutina hemácias de coelho. Por este motivo, foi utilizado no ensaio para medida da atividade hemaglutinante de BanLec suspensão de hemácias de coelho 2%.

A ausência de ligação entre a BanLec e os carboidratos presentes na superfície das hemácias foi caracterizada pela sedimentação das hemácias no fundo da placa, e quando houve aglutinação, as hemácias formaram uma trama difusa. Desse modo, o ponto de maior título de hemaglutinação correspondeu ao último ponto em que foi possível detectar hemaglutinação sem que fosse observada a decantação das hemácias, quando comparadas ao controle negativo.

Os ensaios de hemaglutinação utilizando extrato de proteínas de banana Figo, Pacovan, Mysore, Terra e Nanicão são apresentados na Figura 2.

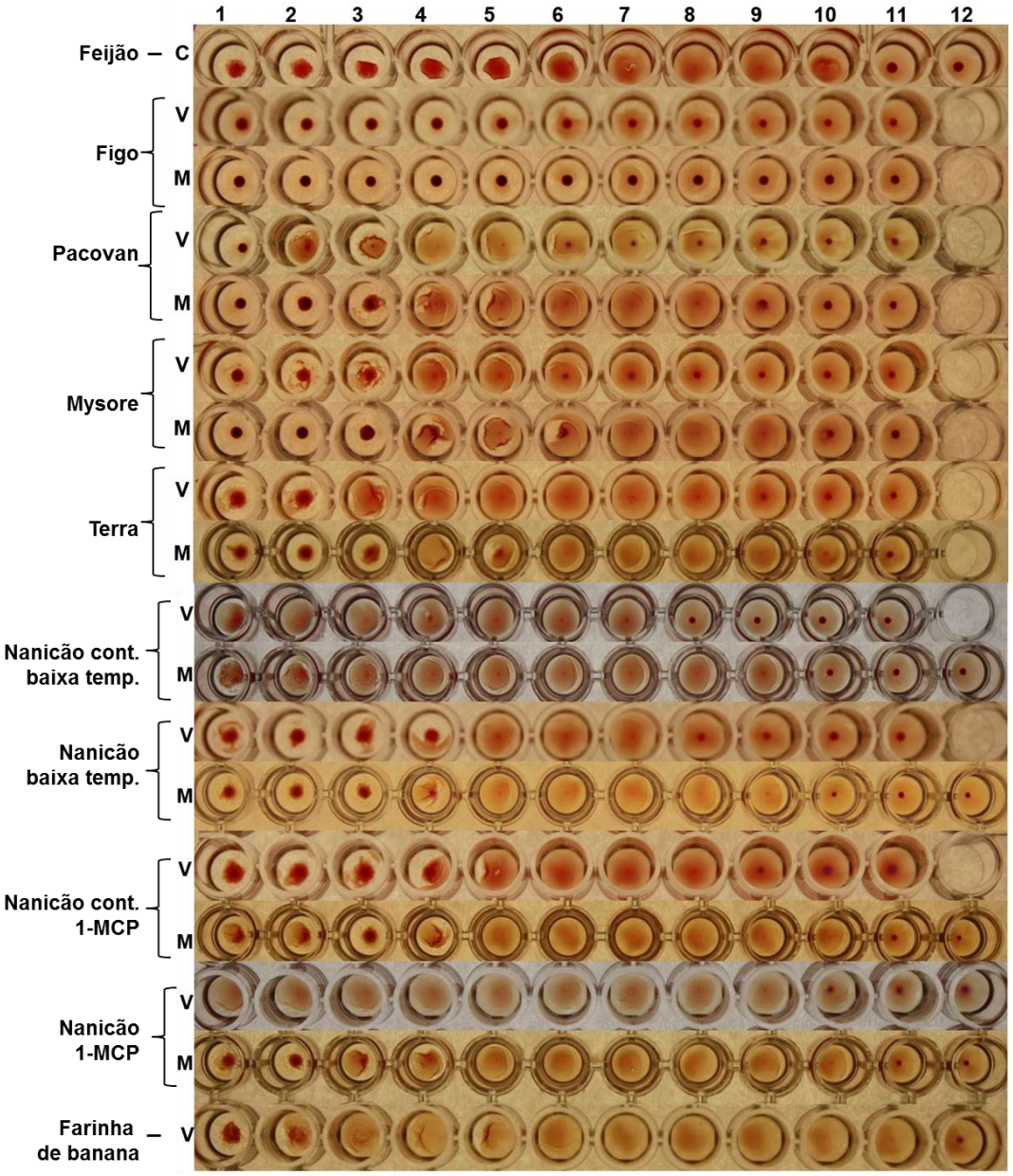

Figura 2. Ensaio de atividade hemaglutinante utilizando hemácias de coelho 2% em placa de microtitulação. As letras à esquerda da tabela representam as linhas, sendo C para o controle, V e M para extratos de banana verde e madura, respectivamente. Os números acima das colunas da esquerda para a direita representam: extrato puro (coluna 1), extrato diluído 1:2 (coluna 2) e assim sucessivamente até a coluna 11, que representa a diluição 1:1024. O poço na linha C, coluna 12, corresponde ao controle negativo.

Por ter grandes quantidades de lectina, o extrato de proteínas de feijão foi utilizado como controle positivo, sendo um indicativo de que o ensaio funcionou adequadamente. Na linha C, observa-se que a aglutinação das hemácias pode

variar desde forte (colunas 1 a 5) a moderada (colunas 6 a 10), com provável reação negativa (colunas 11 e 12).

Devido ao grande número de amostras analisadas foi necessário utilizar diferentes lotes de sangue de coelho para a realização do teste de hemaglutinação, que foram inicialmente adquiridos do Fornecedor A. Os dois primeiros lotes mostraram resultados semelhantes, com a discreta diferença de uma diluição no título de hemaglutinação entre as análises. Porém, quando realizamos os ensaios utilizando o sangue de coelho adquirido do Fornecedor B, observamos que os títulos de hemaglutinação obtidos com esse lote de sangue estavam muito abaixo dos anteriormente observados. Decidiu-se, então, por utilizar novamente sangue de coelho do Fornecedor A, no entanto, surpreendentemente, os resultados obtidos também estiveram bem abaixo dos resultados anteriormente observados para esse mesmo fornecedor. Um dado muito interessante obtido com esse ensaio foi o fato da cultivar Figo não apresentar atividade hemaglutinante, independentemente do fornecedor de sangue de coelho, seja com extratos de banana verde ou madura.

Diante das diferenças entre os resultados obtidos com os diferentes lotes de sangue de coelho, foi constatado que o sangue fornecido para os primeiros ensaios de hemaglutinação realizados foram provenientes do mesmo animal, porém, o material fornecido posteriormente foi de outro coelho do mesmo sexo e raça. O sangue de coelho fornecido pelo Fornecedor B correspondeu a um *pool*, pois era material proveniente do abatedouro de animais.

De acordo com PUSZTAI et al. (2008), as lectinas aglutinam eritrócitos de maneira específica, incluindo especificidade para grupo sanguíneo dentro da mesma espécie, porque elas têm a capacidade de reconhecer e se ligar a estruturas de carboidratos distintas. Esta informação nos forneceu base para sugerir que os resultados discrepantes que obtivemos com os ensaios de hemaglutinação foram decorrentes da provável diferença de grupo sanguíneo nos lotes de sangue que foram utilizados nos testes.

A classificação para grupo sanguíneo utilizada para outros animais (como os coelhos, por exemplo) difere do sistema ABO adotado para os humanos. Os antígenos celulares do coelho têm sido investigados desde 1901, quando um grupo de pesquisadores em um estudo sobre anemia observou que os coelhos podiam produzir hemolisina e aglutinina contra eritrócitos da mesma espécie (COHEN, 1955). JOYSEY (1955) propôs uma classificação que englobava todos os principais

alelos já descritos, e sugeriu que fossem chamados de G^a, G^b e G^o, e também constatou que as células mais fortemente aglutináveis (ou seja, com maior título de hemaglutinação) possuem mais sítios de ligação de antígenos (para o anticorpo em questão) do que as menos aglutináveis (com menor título de hemaglutinação).

Diante disso, é possível supor que as diferenças encontradas nos ensaios de hemaglutinação foram decorrentes dos variáveis lotes de sangue de coelho recebidos, com prováveis diferenças nos grupos sanguíneos. Porém, não realizamos o teste para tipagem sanguínea destas amostras para comprovar esta hipótese, pois quando essa questão foi levantada, já não havia material adequado para esta análise, uma vez que nenhum dos métodos de preservação das hemácias listados na literatura se mostrou eficaz para a reprodução do teste. Outra questão levantada, diante dessas diferenças, seria por qual alelo a BanLec tem maior especificidade de ligação, no entanto, não existem dados na literatura sobre essas informações.

De qualquer forma, apesar da discrepância entre os resultados obtidos com os diferentes lotes, após análise estatística utilizando o teste de Tukey é possível afirmar que o título de hemaglutinação dos extratos é significantemente maior ($p < 0.05$) com o amadurecimento da banana (Figura 3), confirmando observações anteriores feitas por PEUMANS et al. (2002) para a cultivar *Grand Naine* (subgrupo Cavendish).

O fato da cultivar Figo não ter apresentado atividade hemaglutinante não descarta a presença de BanLec nestes extratos, podendo ser um indicativo de que essa cultivar possui uma quantidade tão pequena dessa proteína que não pode ser detectada por esta metodologia. Entretanto, fazendo uma análise comparativa entre os genótipos das cultivares estudadas, a cultivar Figo é a única que possui dois genomas B no seu grupo genômico (ABB).

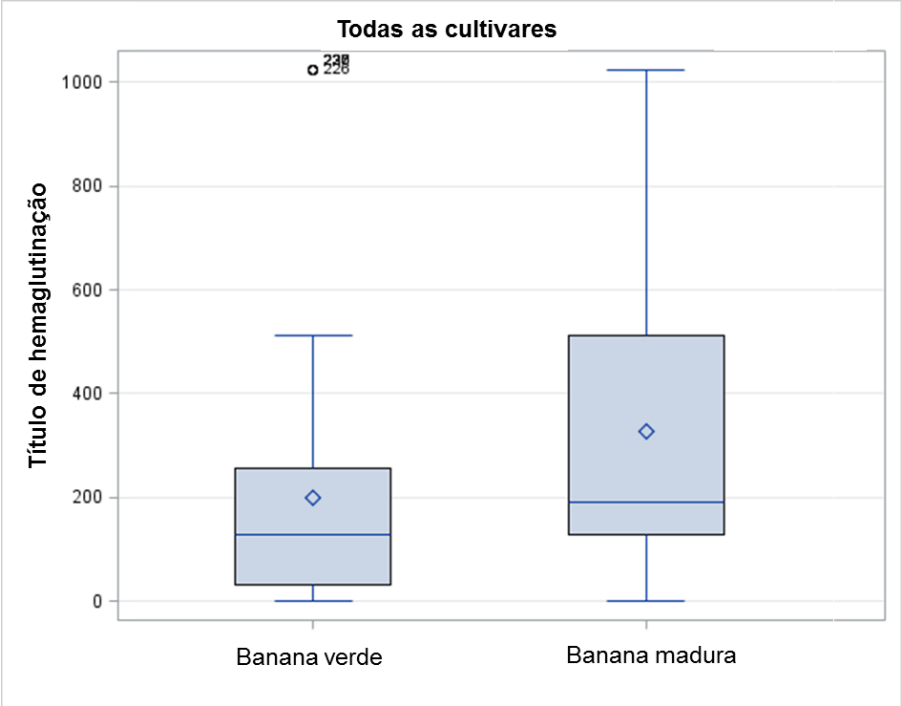

Figura 3. Distribuição dos títulos de hemaglutinação de todas as cultivares. A análise estatística pelo método de Turkey demonstrou que extratos de bananas maduras apresentaram títulos de hemaglutinação significativamente maiores do que os extratos de bananas verdes ($p < 0,05$). As barras abaixo e acima da caixa indicam o menor e maior valor observado, respectivamente.

O genótipo das bananas vem sendo estudado por influenciar em alguns fatores, tais como suscetibilidade à queda natural dos frutos da banana (PEREIRA et al., 2004) e danos nos frutos causados pelo frio (LICHTEMBERG et al., 2001), como tentativa de diminuir a perecibilidade pós-colheita dos frutos. O primeiro estudo mostrou que a presença do genoma B em diferentes cultivares pode estar associada à resistência ao despencamento dos frutos, corroborando dados do segundo estudo que mostra que a presença do genoma B no genótipo das bananas está relacionada à resistência a baixas temperaturas tanto no campo quanto durante o armazenamento pós-colheita. Embora esses estudos correlacionem o efeito do genoma B com a resistência dos frutos de banana, até o momento não existem relatos de que o genótipo possa influenciar na quantidade de BanLec presente na polpa de bananas. Esta hipótese não pode ser descartada, uma vez que a presença do genoma B também pode estar relacionada com as diferenças entre os resultados obtidos até o momento, porém no nosso trabalho não foi possível analisar outra cultivar com mais de um genoma B além da cultivar Figo.

Embora a banana da cultivar Terra seja geralmente consumida após algum tipo cozimento ou fritura, os ensaios de hemaglutinação realizados para esta cultivar foram realizados sem tratamento térmico prévio. Os resultados desses ensaios são apresentados na Figura 4 sugerindo que possivelmente existem grandes quantidades de BanLec na banana madura da cultivar Terra, devido aos altos títulos de hemaglutinação observados.

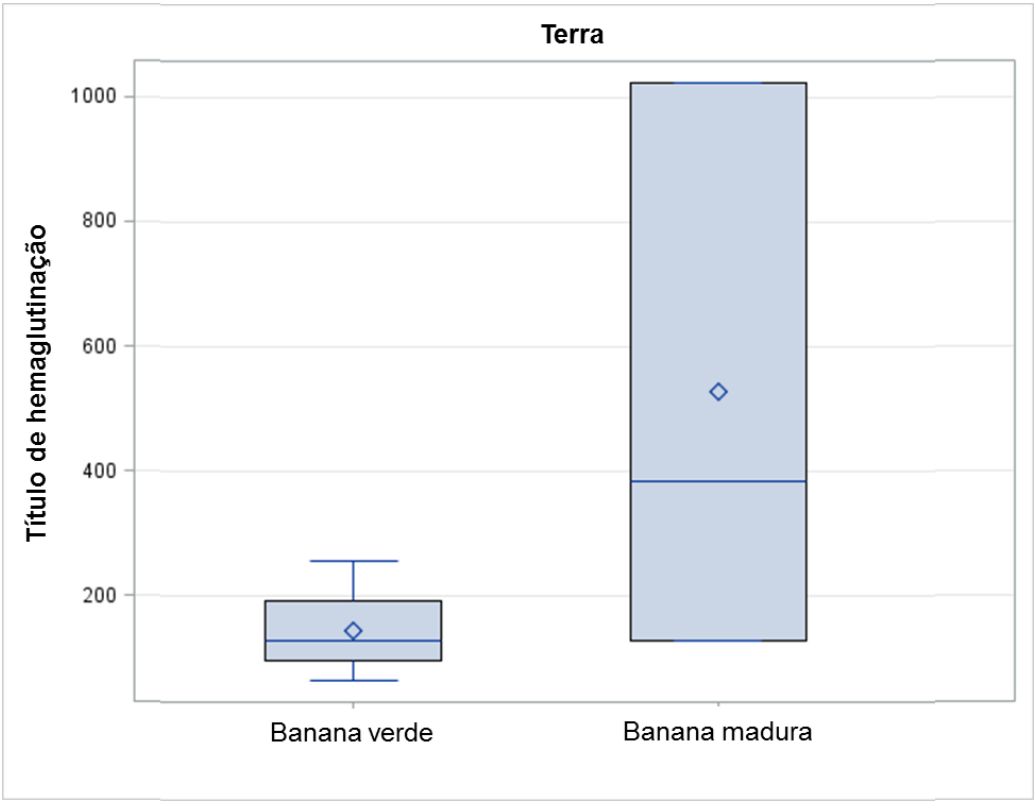

Figura 4. Distribuição dos títulos de hemaglutinação utilizando extratos de banana verde e madura da cultivar Terra. A análise estatística pelo método de Turkey demonstrou que extratos de bananas maduras apresentaram títulos de hemaglutinação significativamente maiores do que os extratos de bananas verdes ($p < 0,05$). As barras abaixo e acima da caixa indicam o menor e maior valor observado, respectivamente.

Para a cultivar Nanicão, foram analisados extratos brutos de bananas que foram submetidas a armazenamentos em baixa temperatura (Figura 5 A), exposição ao 1-MCP (Figura 5 B), grupo controle desses tratamentos (Figura 5 C e D) e farinha de banana verde. Os extratos de farinha de banana verde apresentaram altos títulos de hemaglutinação, indicando maior quantidade de BanLec nesse material, provavelmente por ser um produto processado e concentrado.

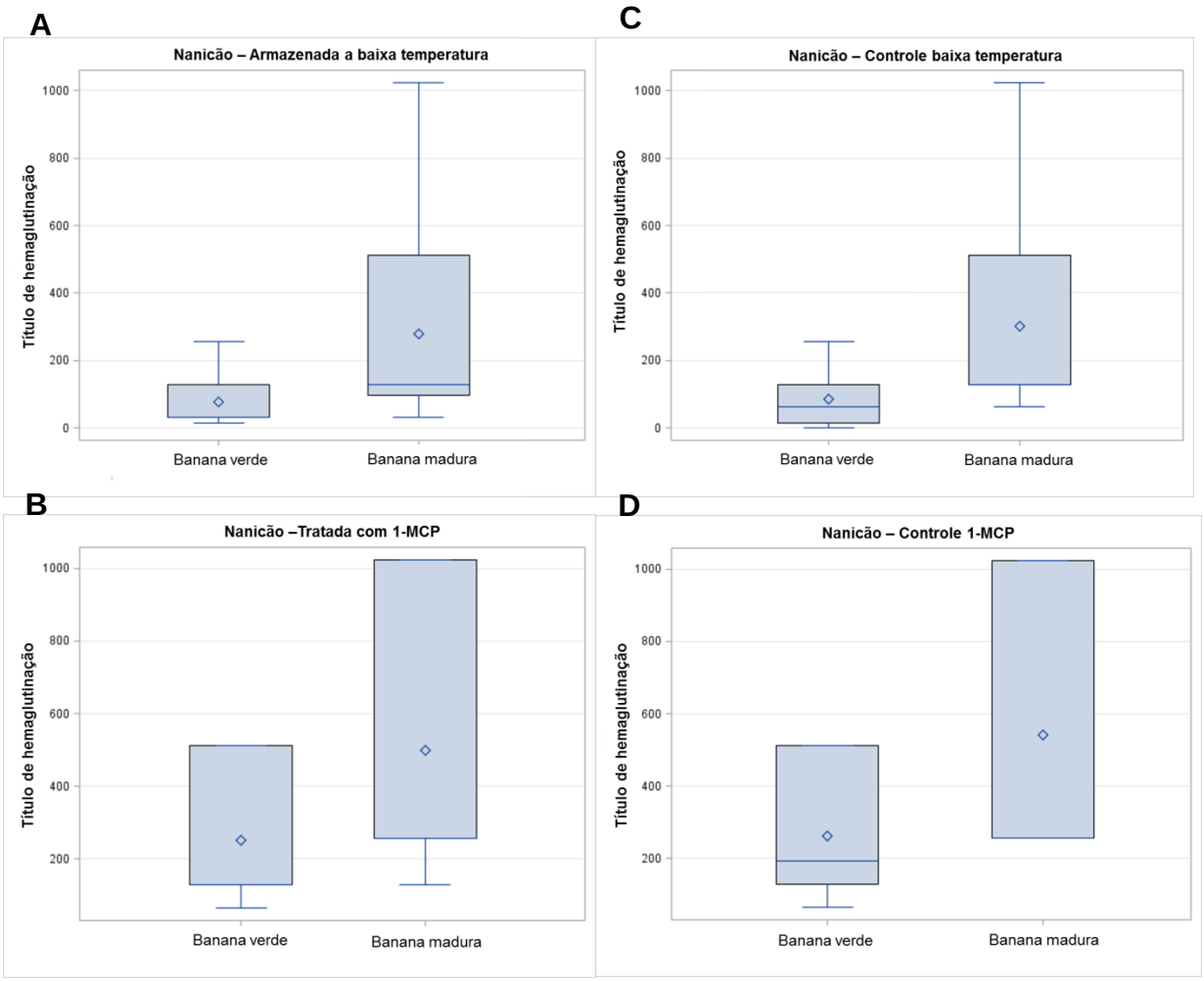

Figura 5. Distribuição dos títulos de hemaglutinação utilizando extratos brutos de banana verde e madura da cultivar Nanicão. A: bananas submetidas a armazenamento em baixa temperatura; B: bananas submetidas a tratamento com 1-MCP; C e D: respectivos controles das amostragens. A análise estatística pelo método de Turkey demonstrou que extratos de bananas maduras apresentaram títulos de hemaglutinação significativamente maiores do que os extratos de bananas verdes ($p < 0,05$). As barras abaixo e acima da caixa indicam o menor e maior valor observado, respectivamente.

Os extratos de banana madura dessa cultivar que foram submetidos ao tratamento com baixa temperatura apresentaram título de hemaglutinação menor quando comparados aos extratos do grupo controle ou aos extratos dos frutos submetidos ao tratamento com 1-MCP. Embora CAAMAL-VELÁSQUEZ et al. (2007), que encontraram genes com características de lectina na polpa de frutos submetidos à injúria pelo frio, e PEUMANS et al. (2002), que relataram maiores níveis de BanLec nas bananas que foram submetidas a tratamento com etileno exógeno, até o momento não há um estudo comparativo entre os níveis de BanLec em bananas submetidas a diferentes tratamentos. Os resultados obtidos nesse trabalho, portanto,

sugerem que bananas que foram armazenadas a baixa temperatura tem níveis mais baixos de BanLec quando comparadas às bananas tratadas com 1-MCP. Entretanto, não foi possível observar diferenças significativas entre as amostras tratadas e seus respectivos grupos controle, podendo sugerir que os tratamentos realizados não influenciam nos teores de BanLec.

Quando comparado se há diferença estatística ($p < 0.05$) entre as cultivares analisadas, observou-se que as médias dos títulos de hemaglutinação utilizando extratos de farinha de banana verde (cv. Nanicão) foram maiores do que os outros extratos de banana verde de todas as cultivares testadas no estudo. Além disso, foi possível observar que extratos de banana da cultivar Nanicão que foram submetidos ao tratamento com 1-MCP e curiosamente as bananas que corresponderam ao grupo controle desse tratamento também apresentaram diferenças estatisticamente significantes de todas as outras amostras de banana verde testadas no estudo, com exceção de extratos de banana da cultivar Terra. O mesmo padrão é observado quando analisamos o efeito das cultivares utilizando extratos de bananas maduras

Os ensaios de hemaglutinação foram realizados para termos uma visão geral das amostras que estavam sendo analisadas. Em vista do maior título de hemaglutinação, algumas cultivares apresentaram maior potencial para futuros estudos de purificação e aplicação de acordo com as suas propriedades biológicas, como por exemplo, Nanicão e Terra. Por esse motivo, seria interessante proceder a quantificação de BanLec nos extratos totais de banana das diferentes cultivares. De fato, houve uma tentativa de realizar esta quantificação pelo método de imunoadsorção enzimática (ELISA), mas os resultados obtidos não foram conclusivos e, portanto, não foram apresentados.

2.4.2. Perfil eletroforético e Imunodetecção de BanLec nos extratos de banana

Pela coloração com azul de coomassie foi possível observar em algumas cultivares possível banda de BanLec com peso molecular entre 13 KDa e 15KDa, em concordância com dados previamente publicados (KOSHTE et al., 1990; PEUMANS et al., 2000; WONG; NG, 2006). Na Figura 6, são apresentados resultados utilizando extratos de bananas verdes e maduras. As Figuras 6 A e B representam SDS-PAGE com extratos de banana das cultivares Pacovan e Mysore,

e Figo e Terra, respectivamente, enquanto as Figuras 6 C e D correspondem ao Western blotting dessas amostras.

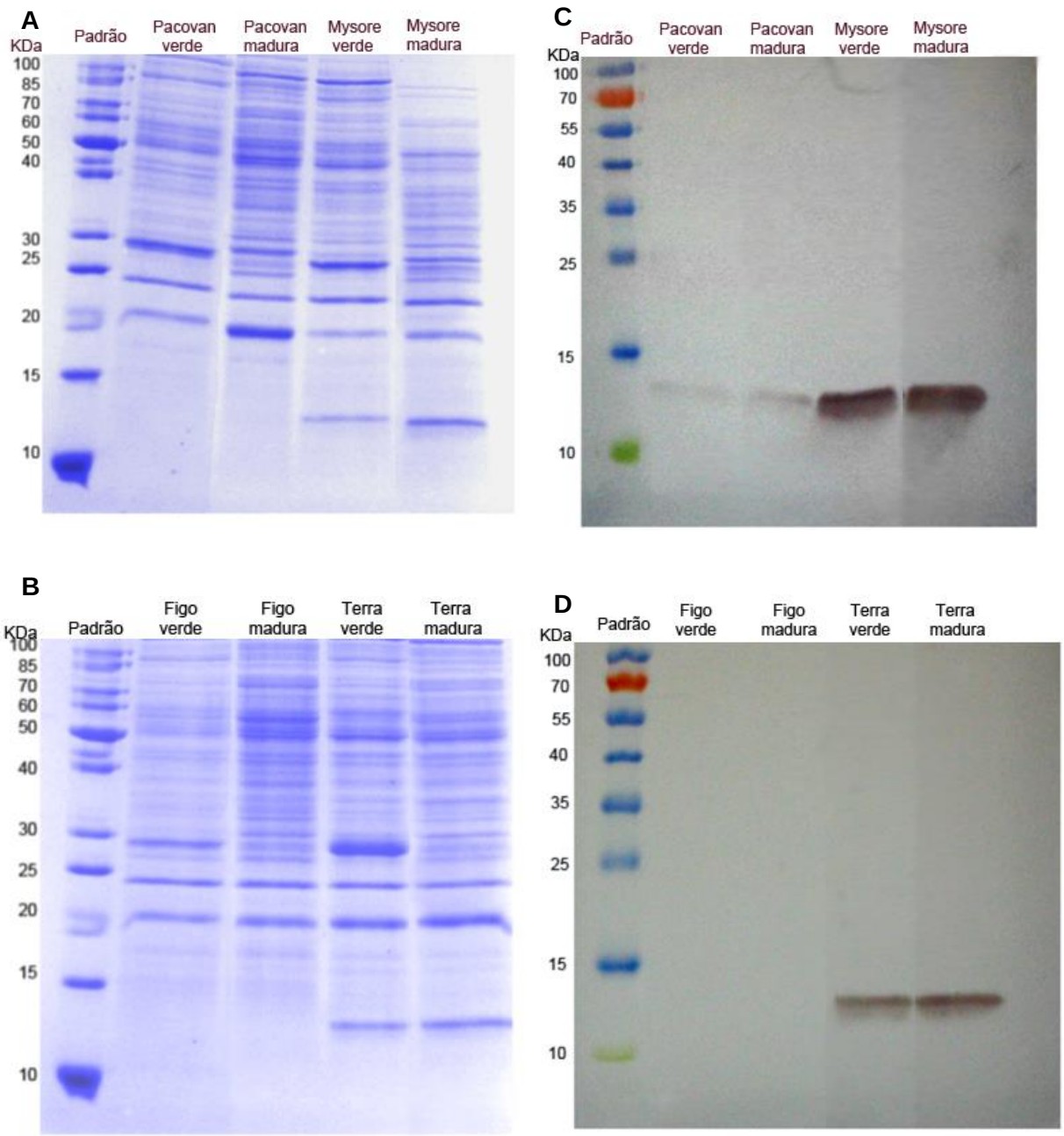

Figura 6. Imunodetecção de BanLec em extratos de proteínas de bananas das cultivares Pacovan, Mysore, Figo e Terra, nos estádios de maturação verde e maduro. A e B: SDS-PAGE corado para proteínas totais com azul de coomassie. C e D: Western blotting em membrana de nitrocelulose para detecção de BanLec anticorpo anti-BanLec de coelho (diluição 1:2000) usando extratos de banana. Os números à esquerda de cada banda do padrão correspondem às respectivas massas moleculares.

Para a cultivar Pacovan não foi possível observar a banda correspondente a BanLec no gel de poliacrilamida, e a análise dessa proteína por Western blotting

mostrou resultados fracamente positivos, o que sugere pequenas quantidades de BanLec nesta cultivar. No entanto, na eletroforese com extratos proteicos da cultivar Mysore é possível observar a banda que provavelmente correspondente à BanLec nos estádios de maturação verde e maduro, sendo que, aparentemente, na banana madura a banda está mais forte, como confirmado pelo Western blotting. Estes resultados corroboram os ensaios de hemaglutinação, em que foi observado título de hemaglutinação baixo para a cultivar Pacovan e mais alto para a cultivar Mysore.

Quando analisados extratos proteicos da cultivar Figo, é interessante notar que a banda correspondente a BanLec não foi observada tanto no gel de poliacrilamida quanto na análise por Western blotting, corroborando os resultados do teste de hemaglutinação, em que não houve atividade hemaglutinante para esta cultivar nas amostras de banana verdes ou maduras. Para a cultivar Terra, foi possível observar na eletroforese prováveis bandas de BanLec que foram confirmadas na análise por Western blotting e que mostraram um padrão de banda reativa discretamente mais forte na banana madura. Estes resultados também confirmam as análises dos ensaios de hemaglutinação, sugerindo quantidade maior de BanLec na banana madura quando comparada à verde também nesta cultivar.

Na Figura 7 A são apresentados os resultados de SDS-PAGE dos ensaios realizados com extratos de banana da cultivar Nanicão. A presença de BanLec nesses extratos proteicos foi confirmada pelo Western blotting (Figura 7 B). Nos extratos de amostras após armazenamento a baixa temperatura quase não é possível observar as bandas características de BanLec, pois foram coradas muito fracamente pelo azul de coomassie. A fraca expressão de BanLec nesses extratos é confirmada nas análises por Western blotting. Contudo, quando são analisados os extratos de amostras de bananas tratadas com 1-MCP, amostras controle sem tratamento e para a farinha de banana verde, é possível observar a banda de BanLec confirmada pela forte reação positiva na análise por Western blotting. Esses dados também corroboram os ensaios de hemaglutinação, pois os extratos de bananas da cultivar Nanicão submetidos a tratamento com baixa temperatura não evidenciaram altos títulos de hemaglutinação, e as análises realizadas com os extratos de bananas tratadas com 1-MCP, controle não tratado e farinha de banana verde apresentaram títulos de hemaglutinação maiores.

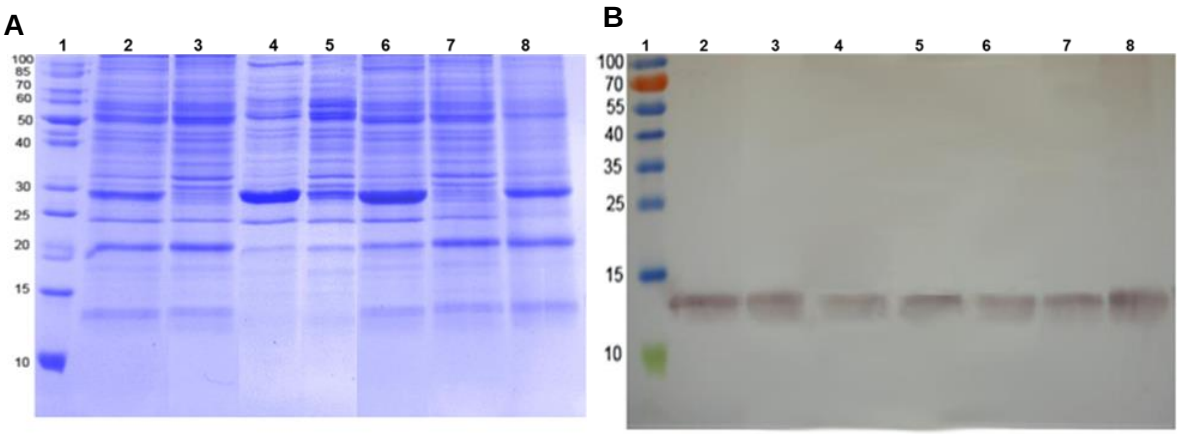

Figura 7. Perfil eletroforético e Imunodetecção de BanLec em extratos de proteínas de bananas da cultivar Nanicão. **A:** SDS-PAGE corado para proteínas totais com azul de coomassie. **B:** Western blotting em membrana de nitrocelulose para detecção de BanLec utilizando anticorpo anti-BanLec de coelho (diluição 1:2000), usando extratos de banana. Os números à esquerda de cada banda do padrão correspondem às respectivas massas moleculares. 1: Massa molecular KDa); 2: Banana verde submetida tratamento com 1-MCP; 3: Banana madura submetida a tratamento com 1-MCP; 4: Banana verde submetida a armazenamento a baixa temperatura; 5: Banana madura submetida a armazenamento a baixa temperatura; 6: Banana verde do grupo não tratado; 7: Banana madura do grupo não tratado e 8: extrato de farinha de banana verde.

2.5. CONCLUSÕES

Ainda que realizados com extratos brutos de proteína de banana, os ensaios para medida da atividade hemaglutinante nos permitem afirmar que o título de hemaglutinação é maior na banana madura quando comparada à verde. Além disso, as cultivares Nanicão e Terra apresentaram diferenças estatisticamente significantes das cultivares Pacovan e Mysore, sugerindo que bananas no estádio maduro das cultivares Nanicão e Terra podem apresentar teores de BanLec maiores quando comparadas às bananas das cultivares Pacovan e Mysore.

É possível também que a aglutinação das hemácias gerada por BanLec seja dependente do grupo sanguíneo do animal utilizado, dadas as diferenças observadas com os lotes de sangue de coelho utilizados.

A cultivar Figo não apresentou atividade hemaglutinante, pois a banda correspondente a BanLec não foi visualizada no gel de poliacrilamida, bem como não houve positividade para BanLec quando realizado Western blotting utilizando extratos de banana dessa cultivar. Por esse motivo, acreditamos que a BanLec pode não estar presente na polpa de frutos dessa cultivar. É oportuno comentar que essa é a única cultivar representante do grupo genômico ABB do estudo, pois as outras cultivares utilizadas foram AAB ou AAA. De acordo com estudos anteriormente

mencionados, cultivares com grupo genômico ABB são mais resistentes ao despencamento e injúria pelo frio.

2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRUYNS, A.M.; DE NEVE, M.; DE JAEGER, G.; DE WILDE, C.; ROUZÉ, P.; DEPICKER, A. Quantification of heterologous protein levels in transgenic plants by ELISA. **Methods in Biotechnology**, vol. 3, pp. 251-269, 1998.

CAAMAL-VELÁSQUEZ, J.H.; CHI-MANZANERO, B.H.; CANCHE-YAM, J.J.; CASTAÑO, E.; RODRIGUÉZ-ZAPATA, L.C. Low temperature induce differential expression genes in banana fruits. **Scientia Horticulturae**, vol. 114, pp. 83-89, 2007.

CARPENTIER, S.C. et al. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: an evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, vol. 5, nº 10, pp. 2497-2507, 2005.

CLENDENNEN, S.K.; MAY, C.D. Differential gene expression in ripening banana fruit. **Plant Physiol.**, vol. 11, nº 5, pp. 463-469, 1997.

COHEN, C. Blood group factors in the rabbit. **J. Immunol.**, vol. 74, pp. 432-438, 1955.

GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Atividade inibitória de tripsina do feijão (Phaseolus vulgaris L.): avaliação crítica dos métodos de determinação. **ALAN**, vol. 51, nº 4, pp. 386-394, 2001.

JOYSEY, V.C. A study of the blood groups of the rabbit, with reference to the inheritance of three antigens, and the agglutinability of the red cells carrying them. **J. Exp. Biol**., vol. 32, pp. 440-450, 1955.

KOSHTE, V.L.; VAN DIJK, W.; VAN DER STELT, M.E.; AALBERSE, R.C. Isolation and characterization of BanLec-I, a mannoside-binding lectin from Musa paradisiac (banana). **Biochem. J**., vol. 272, pp. 721-726, 1990.

LICHTEMBERG, L.A.; MALBURG, J.L.; HINZ, R.H. Suscetibilidade varietal de frutos de bananeira ao frio. **Rev. Bras. Frutic.**,vol. 23, nº 3, pp. 568-572, 2001.

LOWE, M.L.; GIN, J.B.; DEMETRIOU, J.A. Stability of erytrocytic enzymes for screening tests. **Clinical Chemistry**, vol. 19, nº 5, pp. 529-530, 1973.

PEREIRA, M.C.T et al. Suscetibilidade à queda natural e caracterização dos frutos de diversos genótipos de bananeiras. **Rev. Bras. Frutic.**, vol. 26, nº 3, pp. 499-502, 2004.

PERONI, F.H.G. **Estrutura do grânulo de amido de banana e sua relação com as enzimas que atuam no metabolismo amido-sacarose.** Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2007.

PEUMANS, W.J.; PROOST, P.; SWENNEN, R.L.; VAN DAMME, E.J.M. The abundant class III chitinase homolog in young developing banana fruits behaves as a transient vegetative storage protein and most probably serves as an important supply of amino acids for the synthesis of ripening-associated proteins. **Plant Physiol.**,vol. 130, pp. 1063-1072, 2002.

PEUMANS, W.J.; WINTER H. et al. Isolation of a novel plant lectin with an unusual specificity from *Calystegia sepium*. **Glycoconjugate Journal,** vol. 14, pp. 259-265, 1997.

PEUMANS, W.J.; ZHANG W. et al. Fruit-specific lectin from banana and plantain. **Planta**, vol. 211, pp. 546-554, 2000.

PUSZTAI, A.; BARDOCZ, S. EWEN, S.W.E. Uses of plant lectins in bioscience and biomedicine. **Frontiers in Bioscience**, vol. 13, pp. 1130-1140, 2008.

SAMBROOK, J; FRITSCH E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed., 3 v. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SOARES, C.A. **Avaliação comparative de características estruturais do amido e enzimas relacionadas à sua degradação em cultivares de banana com padrão distinto do modelo representado pela cultivar Nanicão.** Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2009.

WONG, J.H.; NG, T.B. Purification of a trypsin-stable lectin with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** Vol. 301, pp. 545–550, 2003.

YANG, Y; MA, H. Western blotting and ELISA techniques. **Researcher**, vol. 1, nº 2, pp. 67-86, 2009

CAPÍTULO III

BANLEC INGERIDA POR VIA ORAL É CAPAZ DE MODULAR O SISTEMA IMUNE DE CAMUNDONGOS

3.1. RESUMO

A lectina presente na polpa de bananas possui grande potencial imunomodulador, como foi demonstrado pela capacidade de induzir a proliferação de linfócitos T e algumas citocinas em condições controladas de cultura celular. Contudo, ainda não foi demonstrado que essa proteína é capaz de modular o sistema imune *in vivo* quando administrada por via oral. Portanto, o objetivo do estudo foi isolar essa proteína da polpa de bananas maduras (cv. Nanicão – AAA) e administrá-la por via oral a camundongos BALB/c, diariamente, por sete dias. Inicialmente foi realizado um estudo piloto testando três diferentes doses dessa proteína (10 μg, 50 μg e 200 μg) em animais que tiveram o sangue e timo coletados para análise de linfócitos T (CD3, CD4, CD8 e γδ) ligados à molécula CD69 (ativados) ou não, e citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-2, IL-4, IL-6, TNFα, IFNγ, IL-10 e IL-17). Os resultados apontaram efeito imunomodulador de BanLec após administração oral, que foi dependente da dose administrada. Posteriormente, foi feito um estudo com animais tratados com 50 μg de BanLec, sendo observado aumento de linfócitos T CD4 e diminuição de T CD8 no timo; diminuição dos níveis das citocinas IL-6 e IFNγ no sangue periférico, além de aumento de TNFα, IL-10 e IL-17. Considerando que a IL-17 produzida na ausência de IL-6 não tem efeito patogênico, e que isso esteve associado ao aumento de IL-10, a resposta gerada por BanLec parece ser do tipo anti-inflamatória tardia. Com esses resultados podemos concluir que BanLec administrada por via oral a camundongos teve efeito imunomodulador, sendo que a resposta gerada está diretamente relacionada com a quantidade de proteína administrada e 50 μg de BanLec promoveu uma resposta anti-inflamatória tardia.

3.2. INTRODUÇÃO

A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra o ataque de patógenos, promovendo resposta rápida às infecções, gerando estímulos como a produção de citocinas, ativação do complemento e respostas fagocíticas. (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002). O processo de imunidade adaptativa é um sistema alternativo de reconhecimento a patógenos utilizado pelos vertebrados (BEUTLER, 2004). Nesse caso ocorre uma resposta mais lenta que envolve mecanismos altamente antígeno-específicos, como a produção de anticorpos e imunidade mediada por células, com geração de células de memória imunológica (GARCIA et al., 1999).

O início do processo de imunidade adaptativa depende das moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II, que são expressas principalmente pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) e que tem como principal função servir como transportadores de peptídeos dos antígenos extracelulares à superfície das células, levando a ativação dos linfócitos T helper CD4 (MCDEVITT, 2000). Em um sentido mais amplo, de acordo com o padrão de citocinas produzidas, os linfócitos T CD4 podem ser do tipo T helper (Th) 1 ou Th2. Os linfócitos Th1 secretam interferon γ (IFN γ) e interleucina (IL)- 2, entre outras citocinas, que irão ativar linfócitos T e macrófagos para atacar patógenos de origem viral, bacteriana ou protozoários, enquanto que citocinas secretadas pelos linfócitos Th2, as IL-4 e IL-5, por exemplo, irão estimular os linfócitos B e eosinófilos para combater patógenos extracelulares, em particular os helmintos, além de estarem envolvidos na resposta alérgica de diversas origens (KAUFMANN, 1996).

As substâncias que são capazes de modular o sistema imune, seja suprimindo ou estimulando, são chamadas de imunomoduladores. Alguns imunomoduladores são utilizados com o objetivo de melhorar a resposta do indivíduo frente a um agente infeccioso, por exemplo. Neste caso, ocorre um aumento das células do sistema imune, como os linfócitos T e outras células de defesa (MASIHI, 2000). Durante os últimos anos, vários compostos bioativos isolados de cogumelos, fungos, algas e plantas superiores tem chamado atenção por causa dos seus efeitos imunomoduladores (XIE et al., 2007). No caso das plantas superiores, esses compostos melhoram a atividade de células do sistema imune inato e mudam a resposta do hospedeiro (HOLDERNESS et al., 2008). Uma

vez que o bom funcionamento dos linfócitos T, B e da imunidade inata estão fortemente relacionados ao status nutricional do indivíduo (WICHERS, 2009), o estudo de compostos com potencial imunomodulador vindos da dieta constitui um tema importante, visto que esses alimentos podem auxiliar na manutenção da homeostase do sistema imune em indivíduos saudáveis. Considerando que os efeitos benéficos das lectinas geralmente estão associados ao seu uso em baixas doses (PUSZTAI, 1993), é razoável pensar que as lectinas que são menos abundantes também podem estimular positivamente os sistemas imune e endócrino.

Os efeitos imunomoduladores de BanLec já foram apontados em ensaios *in vitro*. KOSHTE et al. (1992) descreveram que essa proteína é capaz de induzir a produção de IgG4 em células de cultura de sangue periférico humano. Quando usada em quantidades menores do que 10 μg/mL, a BanLec apresentou atividade mitogênica em esplenócitos de camundongos (PEUMANS et. al, 2000; WONG; NG, 2006; CHEUNG et. al, 2009). Além disso, essa proteína estimulou a produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongos (WONG; NG, 2006; CHEUNG et. al, 2009; STOJANOVIC et al., 2010). A BanLec extraída da cultivar Del Monte também foi capaz de causar efeito antiproliferativo em linhagens de células de hepatoma (HepG2) e leucemia (L1210), além de estimular a expressão gênica do fator de necrose tumoral α (TNFα) e IFN γ (CHEUNG et. al, 2009). A inibição da atividade da transcriptase reversa do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1) foi demonstrada por WONG; NG (2006). Nessa direção, um passo adicional foi dado por SWANSON et al. (2010) relatando a capacidade de BanLec se ligar a gp120, a proteína do envelope do HIV-1 rico em manose, bloqueando a infecção. GAVROVIC-JANKULOVIC et al. (2008) produziram em *E. coli* a BanLec recombinante (rBanLec), a qual também estimulou a produção de linfócitos T em células do sangue periférico de humanos quando utilizada em baixas doses. A capacidade de ligação aos linfócitos T de rBanLec foi maior quando comparada à BanLec extraída da polpa de banana da cultivar Grand Nain (*Musa acuminata*).

No primeiro, e único, até o momento, relato de estudo *in vivo* foi conduzido com essa lectina, descrito por DIMITRIJEVIC et al., (2012), foram analisadas a estabilidade e interação de rBanLec com células na superfície da mucosa do trato digestivo de camundongos, além de consequências imunológicas em termos de produção de anticorpos após administração oral. Esse trabalho trouxe a

comprovação da estabilidade e interação de BanLec com a mucosa do intestino, o que reforçou a hipótese de que os já demonstrados efeitos imunomoduladores *in vitro* pudessem ser observados também *in vivo.* Com isso, foi possível traçar os objetivos do nosso trabalho, visto que os linfócitos T e citocinas não foram avaliados após a administração de rBanLec por via oral. Além disso, uma vez que no estudo de DIMITRIJEVIC et al., (2012) foi administrada a rBanLec, optou-se por empregar a forma natural da proteína, pois as características imunomoduladora poderiam ser distintas.

Portanto, o objetivo desse trabalho foi realizar um estudo em que o efeito sistêmico após administração por via oral de BanLec natural fosse avaliado, com a finalidade de fornecer mais informações relacionadas aos efeitos imunomoduladores de BanLec em animais. Para isso, foram selecionados camundongos machos da linhagem BALB/c que receberam por via oral, durante sete dias, três diferentes quantidades de BanLec isolada da polpa de bananas maduras da cultivar Nanicão. O sangue e o timo desses animais foram coletados e a influência de BanLec no sistema imune dos camundongos foi avaliada através da análise de linfócitos T, B e citocinas.

3.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1. Material

3.3.1.1. Banana

Foram utilizadas amostras de polpa de banana madura da cultivar Nanicão compradas em um mercado local. Conforme descrito por WEARNE et al. (2013), quando os frutos alcançaram o estádio de amadurecimento PCI-6-7 (Figura 8), os mesmos foram descascados, cortados e tiveram suas polpas congeladas em presença de nitrogênio líquido e armazenados a -80ºC até serem utilizados para os procedimentos de extração de proteínas e isolamento e purificação de BanLec.

Figura 8. Índice de cor da casca (PCI) de acordo com a escala de cor comercialmente utilizada. Adaptado de AURORE et al, 2009.

3.3.1.2. Camundongos

Foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/c com idade entre 6 e 8 semanas, provenientes do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os animais foram separados por grupos com água e ração *ad libitum* e sob condições ambientais de umidade relativa de 55 ±10%, temperatura de 22ºC ±2, 15-20 trocas de ar por hora e ciclo claro/escuro: 12 horas em ambiente claro/12 horas em ambiente escuro. As informações gerais sobre a ração consumida pelos animais estão disponibilizadas no Anexo 1. O tratamento dos animais só pode ter início após treinamento dos procedimentos que foram propostos no projeto, sendo o manejo dos animais feito de acordo com as Normas do Biotério de Experimentação (Biotério USP, 2014).

3.3.2. Métodos

3.3.2.1. Extração de proteínas de banana com 1,3-diaminopropano

As proteínas de banana da cultivar Nanicão no estádio de maturação maduro foram extraídas de acordo com PEUMANS et al. (2002). Vinte gramas de polpa de banana foram triturados em gral com ajuda de pistilo em presença de nitrogênio líquido e homogeneizados em 120 mL de uma solução 1,3-

diaminopropano 20 mM. Os homogenatos foram transferidos para tubos de 30 mL e centrifugados a 6000 g por 30 minutos a 4ºC, sendo o sobrenadante considerado o extrato de banana, o qual foi utilizado para a etapa de purificação de BanLec.

3.3.2.2. Purificação de BanLec

Após a etapa de extração descrita em 3.3.2.1, as proteínas foram submetidas à precipitação com 80% de sulfato de amônio de acordo com DAWSON et al. (1968) em banho de gelo, sob agitação, por 30 minutos. O material foi centrifugado a 7500 g por 20 minutos a 4ºC e o precipitado dialisado contra tampão PBS (NaCl 140 mM; KCl 3 mM; NaH_2PO_4 10 mM; KH_2PO_4 2 mM pH 7,4) por 36 horas a 4°C, utilizando membrana para diálise Spectra/Por (limite de massa molecular 6-8 KDa), com volume de tampão de pelo menos 100 vezes o volume da amostra dialisada e com no mínimo seis trocas do tampão. O material dialisado foi aplicado em coluna cromatográfica com resina Sephadex G-75 (GE Healthcare Life Sciences), previamente equilibrada com tampão PBS. Após lavagem da coluna com três volumes de PBS, as proteínas adsorvidas foram eluídas com α-metilmanopiranosídeo 0,5 M em tampão PBS. O material eluído foi submetido a outro processo de diálise e cromatografia em coluna Sephadex G-75, como descrito acima, para se obter a BanLec com maior grau de pureza. A quantificação de proteínas do material foi feita utilizando o 2-D Quant Kit (GE Healthcare) seguindo as orientações do fabricante.

3.3.2.3. SDS-PAGE

Para avaliar a qualidade do procedimento de purificação de Banlec utilizou-se a técnica de SDS-PAGE, conforme descrito no Capítulo II, item 2.3.2.7. Os géis foram confeccionados em duplicata, sendo um deles corado com azul de coomassie e o outro transferido para membrana de nitrocelulose para posterior Western blotting.

3.3.2.4. Coloração dos géis de poliacrilamida

Os géis foram corados com azul de coomassie, conforme descrito no Capítulo II, item 2.3.2.8.

3.3.2.5. Western blotting

Para confirmar a presença de BanLec no material purificado, foi realizado Western blotting utilizando anticorpo de coelho anti-BanLec, conforme descrito no Capítulo II, item 2.3.2.9.

3.3.2.6. Ensaio de hemaglutinação

Os ensaios de hemaglutinação nessa etapa do trabalho foram feitos para confirmar a atividade biológica de BanLec antes da administração aos camundongos. O ensaio foi conduzido em duplicata, em placa de microtitulação com poço de fundo côncavo e volume final de 50 μL. Em cada poço foram colocados 25 μL de amostra de BanLec e 25 μL de suspensão de hemácias de coelho 2% previamente tripsinizadas. Foram preparadas diferentes diluições (1:100, 1: 1000, 1:2000, 1:3000 e 1:3500) e distribuídas nos poços, sendo que essas diluições partiram da concentração inicial de 0,25 μg/mL de BanLec. Para o controle positivo, foi utilizado extrato de feijão cru e adicionados em cada poço 10 μL de extrato de feijão + 20 μL de sulfato de amônio 1 M e 20 μL de hemácias de coelho 2% previamente tripsinizadas.

A leitura do resultado do ensaio foi feita visualmente, uma hora após a incubação a temperatura ambiente. O título de hemaglutinação foi definido como o recíproco da maior diluição em que se observou aglutinação (WONG; NG, 2003).

3.3.2.7. Delineamento experimental – Estudo piloto

O objetivo desse estudo piloto (protocolo de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP nº 416 – Anexo 2) foi comparar a resposta imune de camundongos da linhagem BALB/c que receberam BanLec por sete dias por gavagem frente a três diferentes doses dessa proteína. Foram utilizados 25 camundongos machos da linhagem BALB/c divididos

em 5 grupos contendo 5 animais, conforme descrito na Tabela 2. Os animais que não foram submetidos ao procedimento de gavagem, doravante nomeados grupo controle “pré-tratamento”, foram eutanasiados previamente ao início do tratamento. Já os animais que foram submetidos a gavagem, porém receberam PBS no lugar de BanLec, foram nomeados grupo “controle”, e os animais tratados com BanLec foram nomeados “BanLec 10”, “BanLec 50” e “BanLec 200”, de acordo com a quantidade de BanLec que receberam.

Tabela 2. Grupos de animais tratados com BanLec (n= 5 em cada grupo).

Grupos	Tratamento	Dose (μg/ 20g peso corpóreo)
Pré-tratamento	----------	-------
Controle	PBS	-------
BanLec 10	BanLec	10
BanLec 50	BanLec	50
BanLec 200	BanLec	200

Os animais foram submetidos à pesagem corpórea a cada dois dias para ajuste da dose a ser administrada. No primeiro dia do experimento foi feita a coleta de sangue e eutanásia do grupo de animais não-tratados pré-tratamento. Aos animais foi administrado Isoflurano por via inalatória, a 3 – 4% até indução do efeito anestésico. O sangue dos animais foi colhido com seringa, via punção cardíaca (aproximadamente 1,0 mL) e colocado em tubo contendo anticoagulante EDTA K_3. Os animais foram eutanasiados por hipovolemia e subsequentemente colocados em câmara de CO_2 com fluxo de 8 mL/min. O timo foi coletado posteriormente à eutanásia dos animais.

A partir dessa etapa e nos sete dias seguintes, diariamente no início da tarde, os demais grupos de animais receberam por gavagem 200 µL da dose de BanLec purificada de Banana Nanicão de acordo com o grupo ao qual pertenciam, com exceção do grupo controle, que recebeu 200 µL de PBS pH 7,4. No 8º dia após o início do tratamento foi realizada a coleta de sangue e timo dos animais dos demais grupos, como descrito acima.

3.3.2.8. Delineamento experimental – Estudo principal

No estudo principal (protocolo de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP nº 448 – Anexo 3) foram utilizados 50 camundongos machos da linhagem BALB/c divididos em dois grupos: 25 animais fizeram parte do grupo não-tratado (doravante chamado de grupo Controle) e 25 animais receberam diariamente por gavagem, por sete dias, 50 μg de BanLec (nomeado grupo BanLec 50), de acordo com a descrição na Tabela 3.

Tabela 3. Grupos de animais tratados com BanLec (n= 25 em cada grupo).

Grupos	Tratamento	Dose (μg/ 20g peso corpóreo)
Controle	PBS	-------
BanLec 50	BanLec	50

O esquema de tratamento e eutanásia dos animais foi realizado conforme descrito no item 3.3.2.7, com a diferença de nessa fase do estudo haver apenas um grupo tratado com BanLec, que recebeu 50 μg dessa proteína diariamente.

3.3.2.9. Contagem global de leucócitos no sangue periférico dos animais

Foram utilizados 20 μL do sangue periférico total colhido do animal em tubo com anticoagulante EDTA K_3 e diluídos em 400 μL de solução de Turk (1:20), de modo a causar hemólise dos eritrócitos, mas não afeta os leucócitos. A solução foi homogeneizada e uma parte transferida para câmara de Neubauer onde os leucócitos totais foram contados. Após a contagem o material foi dividido e uma alíquota foi congelada para posterior dosagem de citocinas.

3.3.2.10. Contagem global de leucócitos no timo dos animais

O timo foi colhido em 1 mL de meio RPMI (Gibco ®) suplementado com soro fetal bovino (SFB), para evitar a deterioração precoce do material, e cuidadosamente macerado em placa de petri com ajuda de bisturi. Em seguida, 20 μL dessa suspensão foram diluídos em 400 μL de solução de Turk (1:20), sendo uma parte transferida para câmara de Neubauer para contagem de leucócitos totais. Após a

contagem o material foi dividido e uma alíquota foi congelada para posterior dosagem de citocinas.

3.3.2.11. Análise da população de linfócitos por citometria de fluxo

Aproximadamente $0,5x10^6$ células do material analisado foram distribuídos em tubos de poliestireno 12x75 mm e em seguida acrescentados os seguintes anticorpos monoclonais para análise de linfócitos T e de ativação (Biolegend ®): CD3 APC/Cy7 (clone 17A2), CD4 PE/Cy7 (clone GK1.5), CD8a PerCP/Cy5.5 (clone 53-6.7), CD45 FITC (clone 30-F11), CD69 APC (clone H1.2F3) e TCR $\gamma\delta$ PE (clone GL3). Para o estudo principal, foi incluído o anticorpo monoclonal para linfócitos B CD19 PE (clone 1D3 – BD Pharmigen), nas concentrações definidas após titulação prévia dos mesmos, segundo recomendações do fabricante. Após incubação por 20 minutos a temperatura ambiente no escuro, foi feita a lise das hemácias adicionando aos tubos 2 mL de solução NaCl 0,2% por 20 segundos seguida da adição de 2 mL de solução de NaCl 1,6%. O material foi centrifugado a 1800 rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado, após lavagem do material com PBS suplementado com SFB 2% o precipitado foi ressuspendido em 0,4 mL de PBS com SFB 2%. A aquisição das amostras foi feita no citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences), utilizando o programa de aquisição BD CellQuest. Foram contadas aproximadamente 30.000 células no gate de linfócitos, e os dados foram analisados no programa Flow Jo®.

3.3.2.12. Análise de citocinas por citometria de fluxo

A análise de citocinas foi realizada utilizando o kit de citocinas Th1/Th2/Th17 Cytometric Bead Array (CBA – BD Biosciences), seguindo as orientações do fabricante. Foram adicionados 10 μL de cada pérola (*bead*) de captura (correspondente a citocina de interesse a ser analisada/tubo de amostra) em um tubo plástico de 15 mL que foi identificado como “Mix de beads de captura. Dessa forma, se 20 tubos para IL-2 foram analisados, então foram pipetados 200 μL de pérolas de captura para IL-2 e da mesma forma para as outras citocinas analisadas. Em tubos plásticos 12x75 mm, foram adicionadas 25 μL da mistura de pérolas de

captura, 25 μL de amostra (plasma ou suspensão de células de timo) e 25 μL do reagente de detecção “mouse Th1/Th2/Th17 PE”. Os tubos foram incubados por 2 horas a temperatura ambiente, no escuro. Após incubação, cada tubo foi adicionado de 0,5 mL de tampão de lavagem e centrifugado a 200 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e em seguida foram adicionados 150 μL de tampão de lavagem em cada tubo, para posterior análise no citômetro de fluxo (FACS Canto II – BD Biosciences) utilizando o programa BD CellQuest (BD Biosciences). Os dados foram analisados utilizando o programa FCAP Array (BD Biosciences).

3.3.2.13. Análise estatística

Para o estudo piloto, foi utilizado o teste para amostras não pareadas de Wilcoxon-Mann-Whitney empregando o programa estatístico R (The R Foundation for Statistical Computing – versão 3.0.1) para avaliar significância estatística entre as variáveis e para comparação de doses. Para analisar os resultados obtidos com o experimento principal foi aplicado o teste de médias (Tukey), com o auxílio do programa estatístico SAS (Statistical Analysis System – versão 9.3 - SAS Institute, Inc.), considerando um valor estatisticamente significante de $p < 0,05$.

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1. Purificação de BanLec

A principal característica das lectinas é a ligação específica a carboidratos, sendo que BanLec se liga a manose e oligossacarídeos que contenham manose em sua estrutura (KOSHTE et al., 1990) e interage com com cadeias ramificadas de α-glicanos (MO et al., 2001; GOLDSTEIN et al., 2001).

Por esse motivo, em muitos protocolos a cromatografia por afinidade utilizando colunas de Sephadex é utilizada, uma vez que essa resina é constituída de dextrose, sendo a eluição da lectina realizada com α-metilmanopiranosídeo ou α-metilglicopiranosídeo. Como alternativa para os vários procedimentos de purificação de lectinas utilizando técnicas cromatográficas, NAKAMURA-TSURUTA et al. (2008) purificaram a lectina de banana utilizando nano partículas de ouro

diferentes açúcares imobilizados em sua superfície. Embora esses autores tenham utilizado PBS (pH 7,2) contendo 10 mM de 2-mercaptoetanol como solução extratora das proteínas, após a "captura" das lectinas de banana presentes no extrato pelos açucares que revestiam as nano partículas de ouro, o produto obtido foi de alto grau de pureza, como demonstrado através de análises de espectrometria de massa.

A banana é facilmente encontrada e a preços acessíveis, no entanto, o procedimento de extração e purificação de BanLec proveniente do fruto maduro é desafiador, por causa da grande quantidade de amido presente nesses frutos (MO et al., 2001). Provavelmente por esse motivo, a maioria dos procedimentos de purificação de BanLec realizados até o momento utiliza bananas muito maduras, pois a maior parte do amido já foi degradado em açúcares solúveis, e soluções de extração em faixa de pH muito baixa (KOSHTE et al., 1990; PEUMANS et al., 2000), o que diminuiria a interação amido-lectina (WEARNE et al., 2013).

O protocolo para isolamento e purificação de BanLec da polpa de bananas utilizado nesse trabalho foi uma adaptação de várias metodologias, sendo utilizada a cromatografia por afinidade para ligação da BanLec à resina de dextrose com posterior eluição com α-metilmanopiranosídeo. Além disso, foram consideradas as observações de WEARNE et al. (2013), que demonstraram que o rendimento de BanLec utilizando bananas extremamente maduras foi menor quando quando comparados à extração dessa proteína com bananas apresentando PCI 6-7, razão pela qual foram utilizadas bananas com esse grau de amadurecimento. Uma vez que a quantidade de BanLec presente naturalmente no fruto é relativamente baixa, foram necessários vários lotes de purificação para obter quantidade suficiente para a administração dessa proteína aos animais. No entanto, a despeito das dificuldades técnicas no decorrer de todo esse processo, o rendimento médio foi de 25 μg por grama de polpa de banana, que apesar de estar abaixo dos 40 μg/g de polpa relatado por KOSHTE et al. (1990), foi superior aos 10 μg/g relatado por PEUMANS et al. (2000).

3.4.2. Perfil eletroforético e Imunodetecção de BanLec

Os lotes de purificação foram avaliados pelo perfil eletroforético e imunodetecção com anticorpo anti-BanLec. A Figura 9 A mostra o gel corado com azul de coomassie, em que é possível observar bandas únicas correspondente a BanLec, demonstrando boa qualidade no procedimento de isolamento e purificação. Como controle positivo da reação de Western blotting (Figura 9 B), foi utilizada amostra de BanLec recombinante, a qual apresentou massa discretamente maior que a BanLec natural, como já observado por GAVROVIC-JANKULOVIC et al*.* (2008). A imunodetecção apresentou positividade para todas as amostras testadas, confirmando a presença de BanLec em todos os lotes testados.

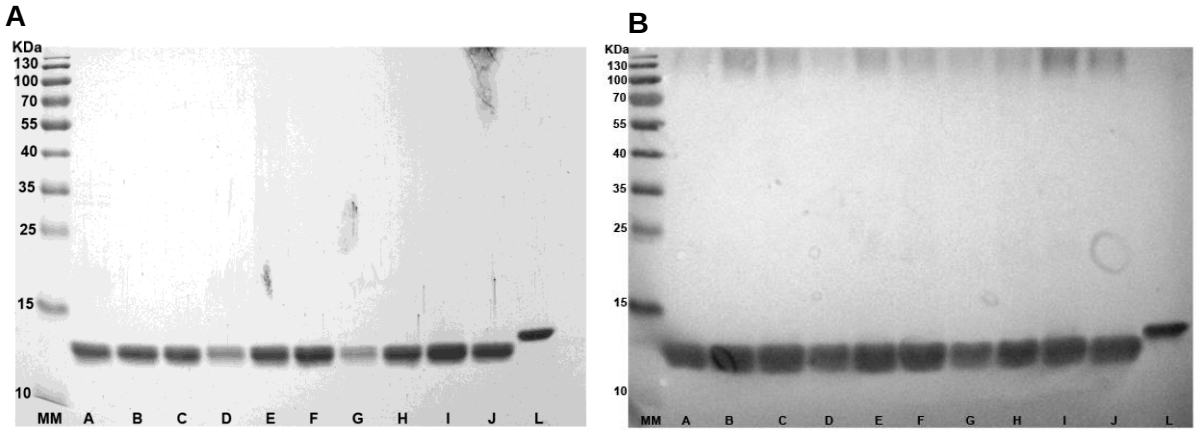

Figura 9. Perfil eletroforético e imunorreativo de preparações de BanLec **A:** SDS-PAGE 15% acrilamida de amostras de BanLec purificadas da polpa de banana cultivar Nanicão, visualizadas através da coloração para proteínas totais com azul de coomassie. **B:** Imunodetecção de BanLec por Western blotting em membrana de nitrocelulose de amostras de BanLec purificadas da polpa de banana cultivar Nanicão, revelada com substrato cromogênico NBT/BCIP. Os números à esquerda de cada banda de padrão correspondem às respectivas massas moleculares (MM). De A a J: lotes de purificação realizados. L: BanLec recombinante.

Para confirmação da identidade, uma das bandas do gel foi recortada e encaminhada ao Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP – USP) para análise em espectrômetro de massas (LTQ-Orbitrap Velos ETD acoplado com Easy nano LC II - Thermo®). As análises foram feitas em duplicata, e o resultado obtido (Anexo 4) mostra duas proteínas principais contendo 141 aminoácidos e massa molecular de 14,6 e 14,7 KDa, respectivamente, sendo ambas com características de lectina. O primeiro relato de purificação de BanLec feito por KOSHTE et al., (1990) apontou uma proteína de massa molecular de aproximadamente 27 kDa na sua forma nativa e de 13 KDa em condições desnaturantes. Entretanto, PEUMANS

et al., (2000) e WONG e NG (2006) descreveram massa molecular de 15 KDa quando desnaturada. Desse modo, os resultados apresentados aqui estão compatíveis com os descritos na literatura e evidencia a presença de BanLec nas preparações administradas aos animais.

3.4.3. Ensaio de hemaglutinação

Antes de administrar BanLec aos animais, a manutenção da atividade biológica dessa proteína foi comprovada através do ensaio de hemaglutinação, utilizando hemácias de coelho 2% (PEUMANS et al., 1997). A Figura 10 ilustra um dos testes realizados com amostras de BanLec purificada em PBS e extrato de feijão cru como controle positivo.

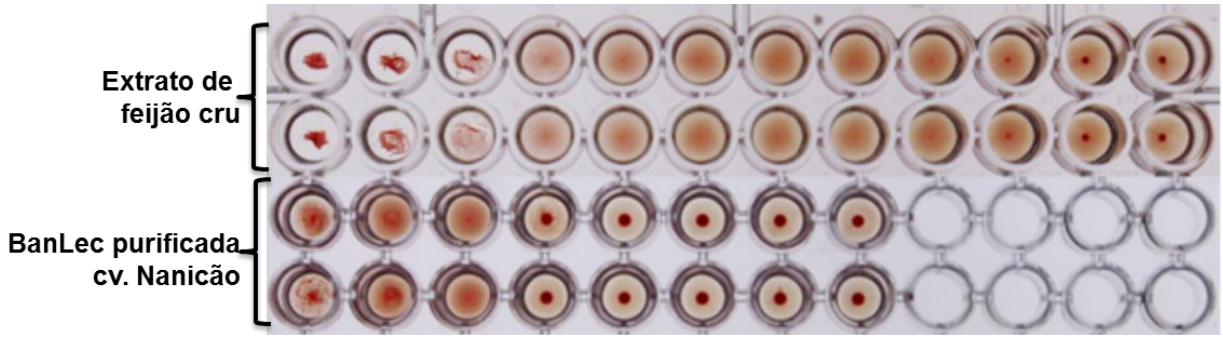

Figura 10. Ensaio de atividade biológica de BanLec, com hemácias de coelho 2% em placa de microtitulação. O ensaio foi feito em duplicada e o extrato de feijão cru foi utilizado como controle positivo da reação, em diluição seriada de fator dois; da esquerda para a direita, o primeiro poço corresponde ao extrato puro, o segundo à diluição 1:2 e assim por diante. No caso de BanLec, o primeiro poço à esquerda corresponde a concentração de 0,25 μg/mL, e as diluições a partir dessa concentração foram: 1:100, 1:1000, 1:2000, 1:2500, 1:3000; 1:3500, 1:4000.

Para os testes com BanLec, partiu-se de 0,25 μg/mL de proteína para realização das diluições de todos os lotes testados e foi possível observar que houve uma variação no título de hemaglutinação entre os lotes, de 1:10 a 1:2000 (Figura 11).

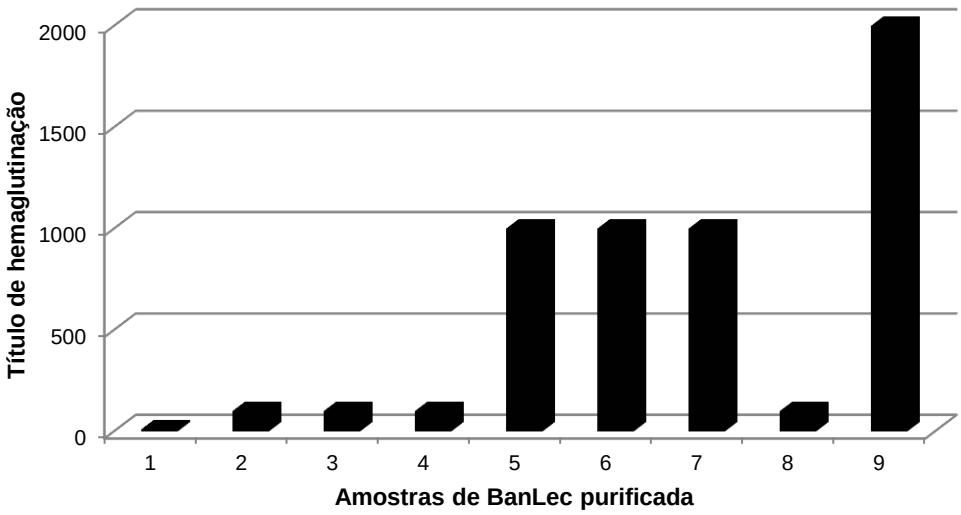

Figura 11. Título de hemaglutinação de BanLec isolada da polpa de banana da cultivar Nanicão. O teste foi realizado em duplicada em microplaca de titulação utilizando hemácias de coelho 2%, previamente tripsinizadas. As diluições partiram da concentração inicial de BanLec de 0,25 μg/mL.

É possível que a diferença observada nos títulos de hemaglutinação dos lotes testados seja devido a presença de diferentes isoformas de BanLec quando purificada de fonte natural, como já apontado por GAVROVIC-JANKULOVIC et al. (2008) ou mesmo porque os ensaios foram realizados em dias diferentes, tendo-se então que levar em consideração a viabilidade das hemácias utilizadas no ensaio. De qualquer forma, para que o ensaio *in vivo* não fosse prejudicado por essas diferenças, foi preparado um *pool* das amostras com alto título de hemaglutinação, o qual foi posteriormente administrado aos animais.

3.4.4. Estudo piloto

STOJANOVIC et al., 2010 e PEUMANS et al., (2000) demonstraram que células de camundongos da linhagem BALB/c responderam melhor aos estímulos de BanLec, quando comparadas às células de camundongos da linhagem C57 BL/6. Por esse motivo, camundongos machos da linhagem BALB/c foram escolhidos para o estudo. A modulação do sistema imune dos animais foi estimada pela investigação de parâmetros imunológicos no sangue periférico e timo. Foram determinadas diferenças nas porcentagens de linfócitos T (CD3, CD4, CD8 e γδ) ligados ou não à molécula de CD69 (linfócitos ativados), e além disso, dosagens de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, TNFα, IFNγ, IL-10 e IL-17).

Alguns resultados das análises por citometria de fluxo do sangue periférico (Figura 12) e timo (Figura 13) dos camundongos são apresentados a seguir. É possível notar as células dispostas entre tamanho (*Forward Scatter* - FSC) e granularidade (*Side Scatter* - SSC). Quanto maior o tamanho da célula, mais ela se desloca para a direita; assim como maior a sua granularidade, mais ela se desloca para cima. Portanto, as células de interesse no estudo (linfócitos), por possuirem pequeno tamanho e baixa granularidade estão dispostas na parte inferior esquerda do gráfico, destacadas com um círculo vermelho.

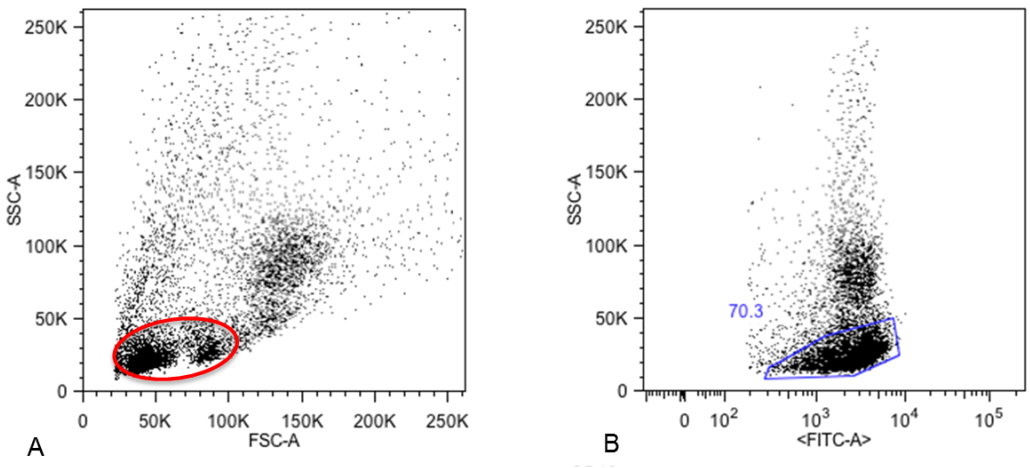

Figura 12. Representação da distribuição de células do sangue periférico de camundongos BALB/c após análise por citometria de fluxo. **A:** Destacado em vermelho estão os linfócitos, células de pequena granularidade (eixo y - Side scatter - **SSC**) e pequeno tamanho (eixo x - Forward scatter – **FSC). B:** Destacado em azul, estão os linfócitos marcados com CD45FITC.

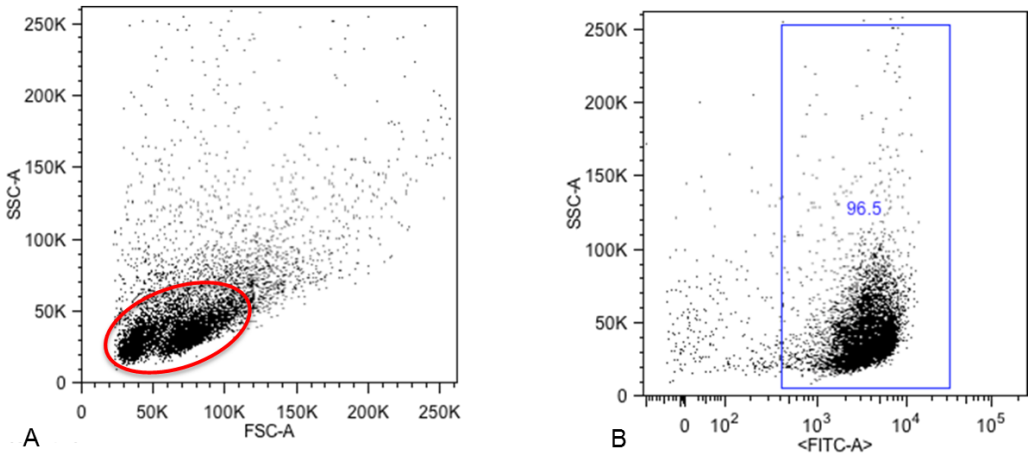

Figura 13. Representação da distribuição de células do timo de camundongos BALB/c após análise por citometria de fluxo. **A:** Destacado em vermelho estão os linfócitos, células de pequena granularidade (eixo y - Side scatter - **SSC**) e pequeno tamanho (eixo x - Forward scatter – **FSC). B:** Destacado em azul, estão os linfócitos marcados com CD45FITC.

Para auxiliar na identificação da população celular estudada, utilizam-se anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos, que reagem com epítopos específicos na superfície ou dentro das células. Para melhor separação dos linfócitos, sem interferência dos monócitos, utilizou-se o anticorpo monoclonal CD45 o qual é expresso em todas as células hematopoiéticas, conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). Nas Figuras 12 e 13 B, os leucócitos totais estão marcados com CD45 FITC, e o *gate* feito na população de linfócitos está destacado em azul. Embora no timo a população de células seja predominantemente linfocítica, o CD45 FITC também foi utilizado, como forma de padronização da técnica utilizada.

Os resultados das medianas de porcentagens de linfócitos T para o sangue e timo são apresentados nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. Os resultados do grupo pré-tratamento não foram apresentados pois esse grupo de animais foi utilizado apenas para estimar o efeito da administração por gavagem que pode ser um procedimento estressante para o animal e poderia alterar algum parâmetro imunológico. Portanto, as análises estatísticas do estudo piloto foram realizadas comparando os animais tratados com BanLec e os animais do grupo controle.

Tabela 4. Medianas e desvios padrões nas porcentagens dos linfócitos T no sangue periférico de camundongos BALB/c submetidos a tratamento com BanLec. Destacado em verde, a diminuição de população de linfócitos T CD4 no grupo BanLec 50.

Linfócito T	Controle	BanLec 10	BanLec 50	BanLec 200
CD3	39,1 ± 10,7	39,6 ± 7,8	35,8 ± 8,7	42,4 ± 6,2
CD4	72,1 ± 4,9	66,2 ± 4,2	63,2 ± 4,4	68,8 ± 2,7
CD8	22,3 ± 3,7	23,5 ± 2,5	25,8 ± 2,5	22,2 ± 3,3
TCR γδ	7,4 ± 3,0	7,0 ± 2,9	10,4 ± 10,8	5,8 ± 2,8
CD3 ativ.	1,1 ± 2,5	1,1 ± 1,8	1,9 ± 3,8	1,9 ± 4,4
CD4 ativ.	0,9 ± 1,8	1,1 ± 1,9	1,7 ± 4,1	1,1 ± 4,0
CD8 ativ.	0,8 ± 4,6	1,2 ± 1,8	2,5 ± 3,8	1,3 ± 6,1
TCR γδ ativ.	2,1 ± 1,7	2,3 ± 3,9	2,8 ± 3,5	3,8 ± 5,5

Conforme apresentado na Tabela 4, houve uma diminuição na população de linfócitos CD4 no sangue periférico de animais do grupo BanLec 50, quando comparados ao grupo controle. Funcionalmente, os linfócitos T (CD3) são divididos em linfócitos T auxiliares (T helper – Th) e linfócitos T citotóxicos, os quais são células da defesa adaptativa do sistema imune. Os linfócitos Th possuem um receptor CD4 na superfície, por isso são mais comumente chamados de linfócito T CD4 e são, indiscutivelmente, as células mais importantes da imunidade adaptativa

(ALBERTS et al., 2002). Essas células se ligam ao complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC-II) e tornam-se ativadas após serem apresentadas a um antígeno pelas células apresentadoras de antígeno (APCs), iniciando então a liberação de citocinas. Os linfócitos T CD4 podem estar diminuídos após exposição às APCs ou infecção por vírus (MARATHIAS et al., 1994). A diminuição dessas células por infecção viral é típica no HIV, o qual se liga aos linfócitos CD4 e se replica, causando a diminuição dessas células no sangue periférico do indivíduo infectado (ARNDT; KEESER, 1989). Indivíduos que possuem no sangue periférico valores de CD4 iguais ou inferiores a 200 células por mm^3 tem possibilidade de progressão à doença, e estão mais susceptíveis a outras infecções (JIAO et al., 2014).

Essas células também podem estar diminuídas em pacientes com tumores cerebrais que já passaram pelo tratamento radioterápico contra o câncer (HUGHES et al., 2005), além de indivíduos portadores de glioblastoma multiforme, que apresentaram níveis dessa população celular muito baixos mesmo sem a apresentação de sintomas (FECCI et al., 2006).

No caso desse estudo, entretanto, não é possível estabelecer uma ligação entre a diminuição da população de linfócitos T CD4 no grupo BanLec 50, pois como será discutido adiante, esse grupo apresentou aumento de IL-17, uma citocina que pode ter sua produção induzida pelas células Th17.

Tabela 5. Medianas e desvios padrões nas porcentagens dos linfócitos T no timo de camundongos BALB/c submetidos a tratamento com BanLec. Destacado em verde e em laranja, diminuição e aumento, respectivamente, das populações de células analisadas.

Linfócito T	Controle	BanLec 10	BanLec 50	BanLec 200
CD3	51,5 ± 5,5	62,4 ± 2,3	66,4 ± 5,7	52 ± 1,9
CD4	57,8 ± 2,3	59,8 ± 2,9	54,4 ± 3,6	56,9 ± 2,5
CD8	41,1 ± 2,0	31,4 ± 1,6	36,1 ± 2,8	40,3 ± 2,3
TCR γδ	4,6 ± 0,7	2,4 ± 0,5	3,3 ± 1,0	4,5 ± 0,5
CD3 ativ.	51 ± 5,5	47,3 ± 2,1	42,5 ± 2,7	56 ± 2,4
CD4 ativ.	56,9 ± 7,1	53,4 ± 1,6	52,9 ± 4,6	62,5 ± 2,5
CD8 ativ.	41,4 ± 3,3	41,7 ± 4,5	33,6 ± 3,7	46,1 ± 2,2
TCR γδ ativ.	32,8 ± 1,7	31,2 ± 1,8	32,8 ± 2,4	36,2 ± 2,5

A Figura 14 ilustra a estratégia de *gate* utilizada para analisar a população de células CD4+ de linfócitos de camundongos do grupo controle (Figura 14 A) e do grupo BanLec 50 (Figura 14 B). Uma vez que os linfócitos CD4 são um subtipo de linfócitos T CD3, foi feito o cruzamento dessas populações e o valor de porcentagem duplo positivo (destacado em rosa) foi obtido.

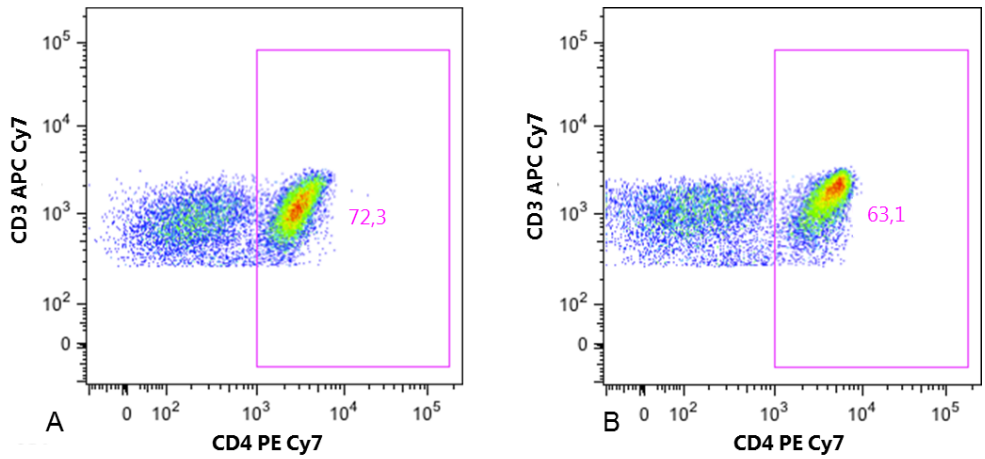

Figura 14. Estratégia de *gate* utilizada para análise de linfócitos T CD4 no sangue periférico. Destaque para o quadro rosa, porcentagem dos linfócitos CD3+/CD4+ **A:** animais do grupo controle; **B:** animais do grupo BanLec 50.

Nas Tabelas 6 e 7, são apresentados os resultados após análise estatística utilizando o teste para amostras não-pareadas de Wilcoxon, no sangue periférico e timo dos animais tratados, respectivamente. Essas tabelas também incluem a significância estatística para as citocinas analisadas, em que foi feita a comparação entre camundongos que não receberam BanLec e os que receberam.

Para avaliar se os linfócitos seriam ativados após administração de BanLec, nós utilizamos o CD69 que é um marcador de ativação precoce dos linfócitos T que aparece após 24 horas de estímulo com lectinas (BISELLI et al., 1992) e tem sido usado tanto *in vitro* como *in vivo* (COSULICH et al., 1987). No timo, a expressão de CD69 parece estar relacionada com o processo de maturação dos linfócitos T e à medida que essas células vão saindo do ambiente tímico, a expressão de CD69 vai diminuindo (VANHECKE et al., 1995). Foi possível observar aumento de linfócitos CD3, CD4 e $\gamma\delta$ ativados somente no timo do grupo BanLec 200. Esses achados serão comentados mais detalhadamente adiante.

Tabela 6. Teste de Wilcoxon para amostras não pareadas para avaliar o efeito de BanLec sobre linfócitos T e citocinas no sangue periférico de camundongos.

BanLec (μg)	CD3	CD4	CD8	γδ	CD3 ativ.	CD4 ativ.	CD8 ativ.	γδ ativ.	IL-2	IL-4	IL-6	TNFα	IFNγ	IL-17	IL-10
10	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
50	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS
200	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS: Diferença não significativa
* Diferença significativa ao nível de 5% ($p < 0,05$)
** Diferença significativa ao nível de 1% ($p < 0,01$)

Tabela 7. Teste de Wilcoxon para amostras não pareadas para avaliar o efeito de BanLec sobre linfócitos T e citocinas no timo de camundongos.

BanLec (μg)	CD3	CD4	CD8	γδ	CD3 ativ.	CD4 ativ.	CD8 ativ.	γδ ativ.	IL-2	IL-4	IL-6	TNFα	IFNγ	IL-17	IL-10
10	**	NS	*	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
50	*	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
200	NS	NS	NS	NS	*	*	NS	*	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS

NS: Diferença não significativa
* Diferença significativa ao nível de 5% ($p < 0,05$)
** Diferença significativa ao nível de 1% ($p < 0,01$)

Nos parâmetros avaliados no sangue periférico, as diferenças significativas foram observadas apenas em relação aos animais do grupo BanLec 50. Embora tenha sido observada diminuição de células CD4+ no sangue periférico desses animais, quando comparados com o grupo controle, no timo de animais desse grupo houve aumento de população de CD3 e diminuição de CD8 ativado. Os linfócitos T citotóxicos (LTc) são também conhecidos por linfócitos CD8+, pelo fato de expressarem essa proteína na sua superfície celular, e secretam moléculas que irão destruir a célula a qual estiverem ligados, estando geralmente associados ao combate às células tumorais ou outros agentes patogênicos, como vírus e bactérias. Em contraste, a ausência ou deficiência desse tipo celular está associada a doenças crônicas autoimunes (PENDER, 2012). Ainda no grupo BanLec 50 foi observado no sangue periférico aumento significativo de IL-17, cuja expressão em sido amplamente relacionada com doenças autoimunes e inflamatórias, como artrite reumatoide, lúpus, asma e rejeição de transplantes (HARRINGTON et al., 2005; WYNN, 2005). No entanto, a origem de sua produção é controversa, pois a ausência de IFNγ provou estar relacionada com o aumento de produção de IL-17. A inibição de sinalização por IFNγ, portanto, pode aumentar o desenvolvimento de células Th17, principais produtoras dessa citocina (HARRINGTON et al., 2005). De fato, no estudo piloto, essa citocina (IFNγ) por muito pouco não teve significância estatística ($p<0,056$), estando diminuída em relação ao grupo BanLec 50, o que iria corroborar essa tese. De qualquer forma, o aumento de população de linfócitos CD3 no timo desse grupo de animais confirma a resposta de natureza inflamatória gerada com essa dose de lectina.

Nos animais do grupo BanLec 10 só foram notadas alterações dos parâmetros imunológicos no timo. Verificou-se aumento de população de linfócitos CD3 sendo que a população de linfócitos CD8 e gamma/delta ($\gamma\delta$) estiveram diminuídas nesse grupo de animais. Alguns pesquisadores tem buscado maior conhecimento no papel dos linfócitos $\gamma\delta$ células na patogênese de doenças autoimunes (SU et al., 2013), e é possível que essas células tenham funções similares àquelas desempenhadas pelos linfócitos CD4+, liberando citocinas e até mesmo funcionando como APCs, dependendo do microambiente em que elas estejam.

No timo dos animais do grupo BanLec 200, foi observado aumento das medianas de CD3+ ativado, CD4+ ativado, γδ ativado e IL-6 quando comparados aos camundongos não-tratados, mostrando que essa dose foi capaz de ativar os linfócitos, deixando o sistema imune dos animais em alerta, como confirmado pelo aumento da IL-6 que normalmente está associada a resposta durante infecção e depois de trauma. Esses resultados confirmam a atividade proliferativa de linfócitos T após indução com BanLec como foi relatada por GAVROVIC-JANKULOVIC et al. (2008), que utilizando células mononucleares do sangue periférico de humanos, observaram que elas foram induzidas com a forma recombinante dessa lectina (rBanLec). A BanLec extraída da cultivar Del Monte induziu expressão de IFNγ, TNFα e IL-2 em esplenócitos de camundongos da linhagem BALB/c, também apresentando efeito antiproliferativo em células leucêmicas (L1210) e de hepatoma (HepG2), além de atividade inibitória da transcritase reversa do HIV-1 (CHEUNG et al., 2009). Do mesmo modo, houve proliferação de linfócitos T e aumento de secreção de IFNγ induzida por rBanLec em esplenócitos de camundongos (STOJANOVIC et al. 2010).

3.4.5. Estudo principal

Com os dados do estudo piloto, foi realizada análise estatística dos dados utilizando o método de Wilcoxon, comparando as três doses utilizadas e o número mínimo de animais necessário para observar significância estatística na maioria dos parâmetros analisados. Dessa forma, foi determinado que o número mínimo de 50 animais e quantidade de 50 μg de BanLec seria ideal para o estudo principal. Embora o efeito proliferativo de linfócitos em células estimuladas com BanLec tenha sido observado somente nos linfócitos T (GAVROVIC-JANKULOVIC et al., 2008), os autores relataram marcação de BanLec com outras populações celulares, inclusive linfócitos B. Portanto, consideramos testar se a BanLec administrada por via oral provocaria alguma mudança nos linfócitos B dos animais, e para isso, acrescentamos às análises o anticorpo monoclonal CD19 conjugado com ficoeritrina (PE).

Nas Tabelas 8 e 9 são apresentados os resultados de porcentagem de linfócitos T no sangue periférico e timo dos animais do grupo BanLec 50. No sangue

periférico observamos diminuição da IL-6 e aumento de IL-10, IL-17 e TNFα. Novamente, a IFNγ por uma margem muito estreita não foi estatisticamente significante, o que nos chamou a atenção para o limite de detecção do kit. Dessa forma, essa citocina foi novamente analisada utilizando um reagente com maior sensibilidade (BD™ Cytometric Bead Array [CBA] Enhanced Sensitivity Flex Set system), o qual nos permitiu observar diminuição estatisticamente significante dessa citocina (p= 0,03). Na Tabela 10 são apresentados os dados para todos os parâmetros imunológicos analisados no sangue periférico e timo, incluindo a reanálise da citocina IFNγ.

Embora no estudo piloto tenhamos observado diminuição de linfócitos T CD4 no sangue periférico do grupo BanLec 50, nessa etapa do estudo foi notado aumento dessa população celular no timo dos animais, além disso, no timo dos camundongos que receberam BanLec também foi observada diminuição de população de linfócitos T CD8.

O aumento de linfócitos T CD4 pode estar relacionado com o aumento da IL-17, citocina que pode ser secretada pelos linfócitos Th17. Em camundongos, QUESNIAUX et al. (2009) relacionaram a IL-17 produzida na presença de IL-6 como tendo uma função patogênica, ou seja, essas citocinas podem sinalizar a mau prognóstico de determinadas doenças, como é o caso de doenças cardiovasculares em pacientes acometidos por artrite reumatoide (HOT et al, 2010) e é possível que a sua produção também seja mediada por IL-23 (MCGEACHY et al., 2007).

Tabela 8. Resultado das médias e desvio padrão nas porcentagens dos linfócitos T no sangue periférico de camundongos BALB/c que foram submetidos a tratamento por via oral com 50 μg de BanLec, além do grupo controle.

Grupo	CD3	CD3 ativ.	CD4	CD4 ativ.	CD8	CD8 ativ.	γδ	γδ ativ.	CD19	CD19 ativ.
Controle	54,5 ± 9	45,1 ± 18,7	68,8 ± 6,7	48,0 ± 19,5	21,2 ± 4,8	45,3 ± 24,7	1,2 ± 0,3	74,2 ± 14,4	37,3 ± 10,5	19,7 ± 15,1
BanLec 50	53,2 ± 12	44,1 ± 15	68,6 ± 8,9	47,5 ± 16,5	21,2 ± 6,4	43,7 ± 21,1	1,2 ± 0,3	71,5 ± 10,8	38,6 ± 11,6	18,0 ± 13,3

Tabela 9. Resultado das médias e desvio padrão nas porcentagens dos linfócitos T no timo de camundongos BALB/c que foram submetidos a tratamento por via oral com 50 μg de BanLec, além do grupo não tratado. Destacado em verde e em laranja, diminuição e aumento, respectivamente, das populações de células analisadas.

Grupo	CD3	CD3 ativ.	CD4	CD4 ativ.	CD8	CD8 ativ.	γδ	γδ ativ.	CD19	CD19 ativ.
Controle	68,3 ± 7,2	41,8 ± 7,4	58 ± 6,7	45,7 ± 5,3	39,4 ± 7,2	37,2 ± 12,4	4,6 ± 0,4	72,3 ± 5,3	4 ± 1,5	42,8 ± 9,1
BanLec 50	64,9 ± 9,9	43,6 ± 4,8	63,2 ± 5,8	46,5 ± 3,7	34,9 ± 5,2	37,3 ± 12,6	4,4 ± 1,4	68,6 ± 7,1	4,1 ± 2,6	43,9 ± 11,6

Tabela 10. Resultado do teste de Tukey para avaliar efeito imunomodulador no sangue periférico e timo de camundongos do grupo BanLec 50.

Material	CD3	CD4	CD8	γδ	CD19	CD3 ativ.	CD4 ativ.	CD8 ativ.	γδ ativ.	CD19 ativ.	IL-2	IL-4	IL-6	TNFα	IFNγ	IL-17	IL-10
Sangue	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	*	*	**	**
Timo	NS	**	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

* NS: Diferença não significativa

* Diferença significativa ao nível de 5% ($p < 0,05$)

** Diferença significativa ao nível de 1% ($p < 0,01$)

Nas figuras 15 e 16 são apresentados os resultados para as citocinas no sangue periférico e timo, respectivamente.

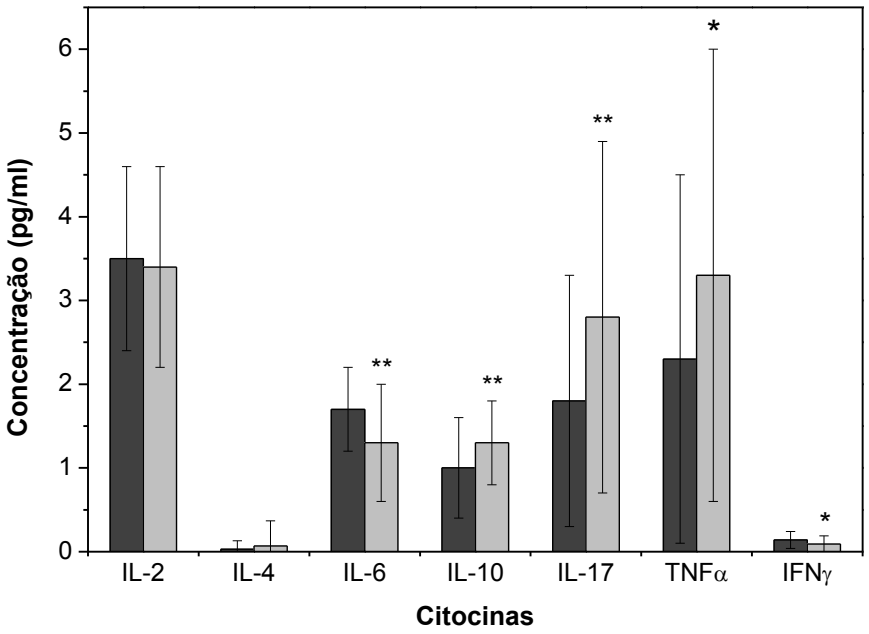

Figura 15. Concentração de citocinas no sangue periférico de camundongos BALB/c. As barras em cinza escuro correspondem aos animais do grupo Controle e as barras em cinza claro o grupo BanLec 50. Foi utilizado o teste de comparação de médias Tukey. Os asteriscos representam as diferenças estatisticamente significantes, sendo (**) p< 0,01 e (*) p<0,05.

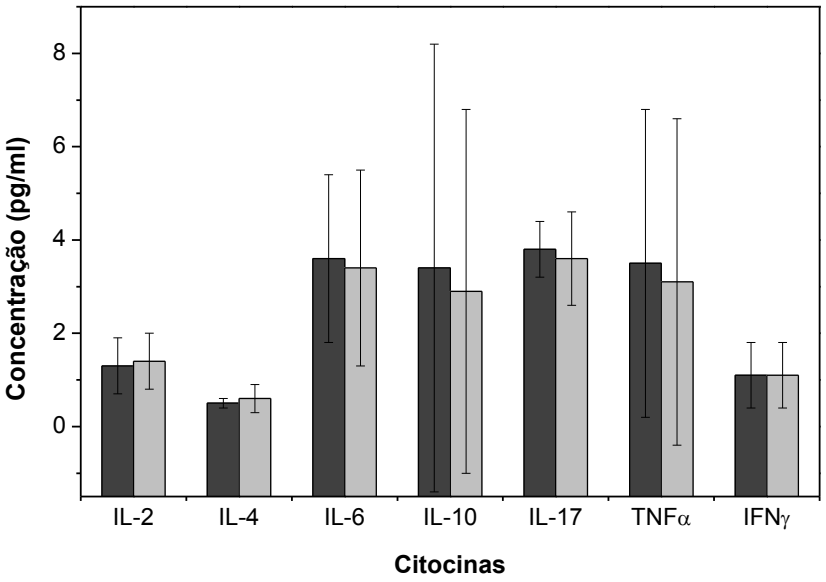

Figura 16. Concentração de citocinas no timo de camundongos BALB/c. As barras em cinza escuro correspondem aos animais do grupo Controle e as barras em cinza claro o grupo BanLec 50. Foi utilizado o teste de comparação de médias Tukey ($p < 0,05$).

As células Th17 podem ser reguladas por diversas vias, entretanto, parece que o fator de crescimento transformante β (TGFβ) tem grande influência na produção de IL-17, com presença ou não de IL-6 (MANGAN et al., 2006). Embora as células Th17 estejam normalmente ligadas às doenças autoimunes, não se pode dizer que todas elas são patogênicas. Existem indícios de que há dois subtipos de células TH17, as patogênicas e as não-patogênicas; as patogênicas, geralmente são produzidas na presença de TGFβ e outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, que irá induzir o fator de transcrição nuclear ligado ao ácido retinóico (RORγt) a produzir células Th17, que constituem um grupo de células pró-inflamatórias (IVANOV et al., 2006). Por outro lado, na ausência de IL-6, ocorre a expressão do fator de transcrição específico para linhagem (Foxp3), que leva a produção de células Th17 com fenótipo de linfócitos T regulatórios (BETTELLI et al., 2006), ou seja, células não-patogênicas que são importantes no controle da autoimunidade e na cascata anti-inflamatória reguladora do sistema imune. Embora não tenhamos feito a dosagem de TGFβ no nosso estudo, os camundongos tratados com BanLec apresentaram níveis de IL-6 diminuídos quando comparados aos camundongos do grupo Controle, como podemos observar na Figura 17, sugerindo que o aumento de IL-17 observado não foi dependente de IL-6, ou seja, provavelmente o subtipo de IL-17 não-patogênica.

A IL-6 é normalmente expressa em linfócitos T, linfócitos B, hepatócitos e outras células da medula óssea, atuando fortemente na hematopoese, principalmente na maturação de linfócitos B e plasmócitos produtores de anticorpos (KISHIMOTO, 2010), além de ativação de linfócitos T e secreção de proteínas de fase aguda pelo fígado. A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória, e geralmente se apresenta aumentada em várias doenças, inclusive autoimune. Como anteriormente relatado, os camundongos do grupo BanLec 50 apresentaram diminuição dessa citocina no sangue periférico quando comparados com os animais do grupo Controle.

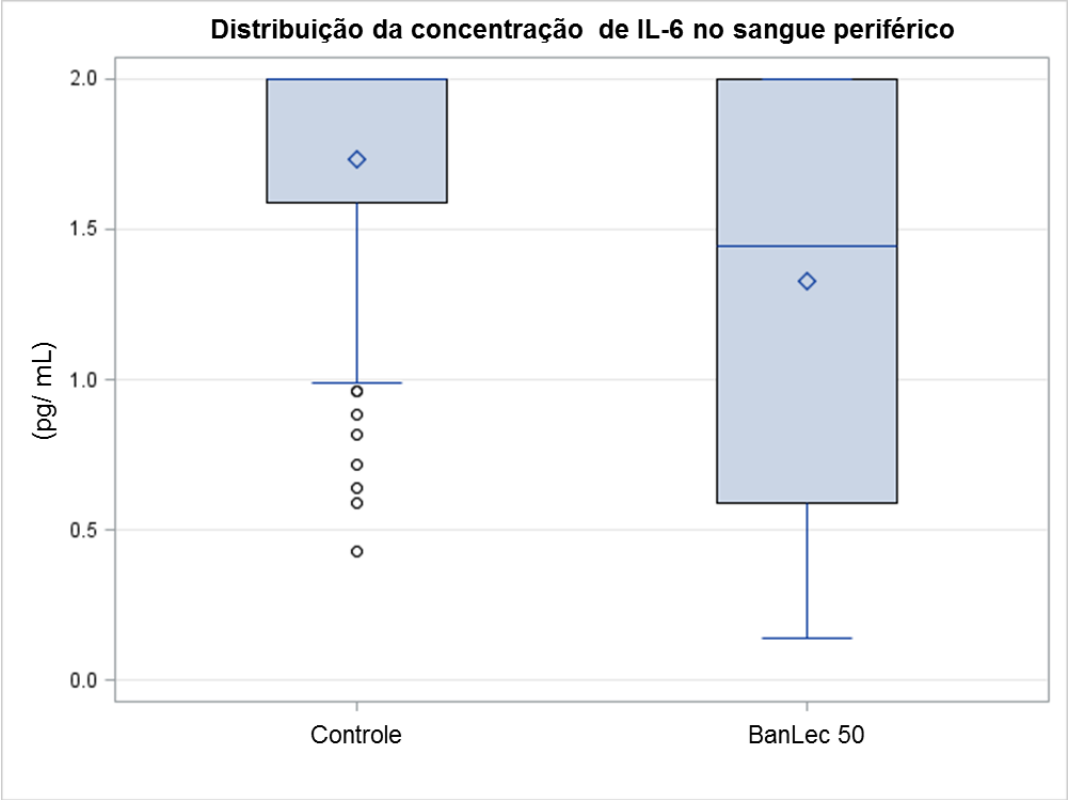

Figura 17. Distribuição da concentração de IL-6 no sangue periférico de camundongos BALB/c do grupo Controle e BanLec 50, utilizando o teste de comparação de médias Tukey. As barras abaixo da caixa indicam os menores valores observados para IL-6.

O TNFα é um potente mediador inflamatório agindo no sistema imune através de indução de produção de citocinas, ativação ou expressão de moléculas de adesão e fatores estimulantes de crescimento (ROTHE et al., 1992) Além disso, também estimula a proliferação de células normais, exerce atividade citostática ou citolítica contra células tumorais e causa efeitos inflamatórios, antivirais e imunoregulatórios (GUPTA, 2002). Esse membro da superfamília TNF é principalmente secretado por macrófagos ativados, no entanto, ele pode ser secretado por outras células, como monócitos, linfócitos T, mastócitos, linfócitos Natural Killer (NK) e outras (STOW et al., 2009). O precursor de TNFα pode sofrer vários eventos de clivagem, liberando dessa forma, potentes moduladores de inflamação (TURNER et al., 2014). A Figura 18 mostra a distribuição da medida de TNFα no sangue periférico dos animais do grupo BanLec 50, sendo possível notar aumento de produção dessa citocina, a qual é inibida na presença de IL-6.

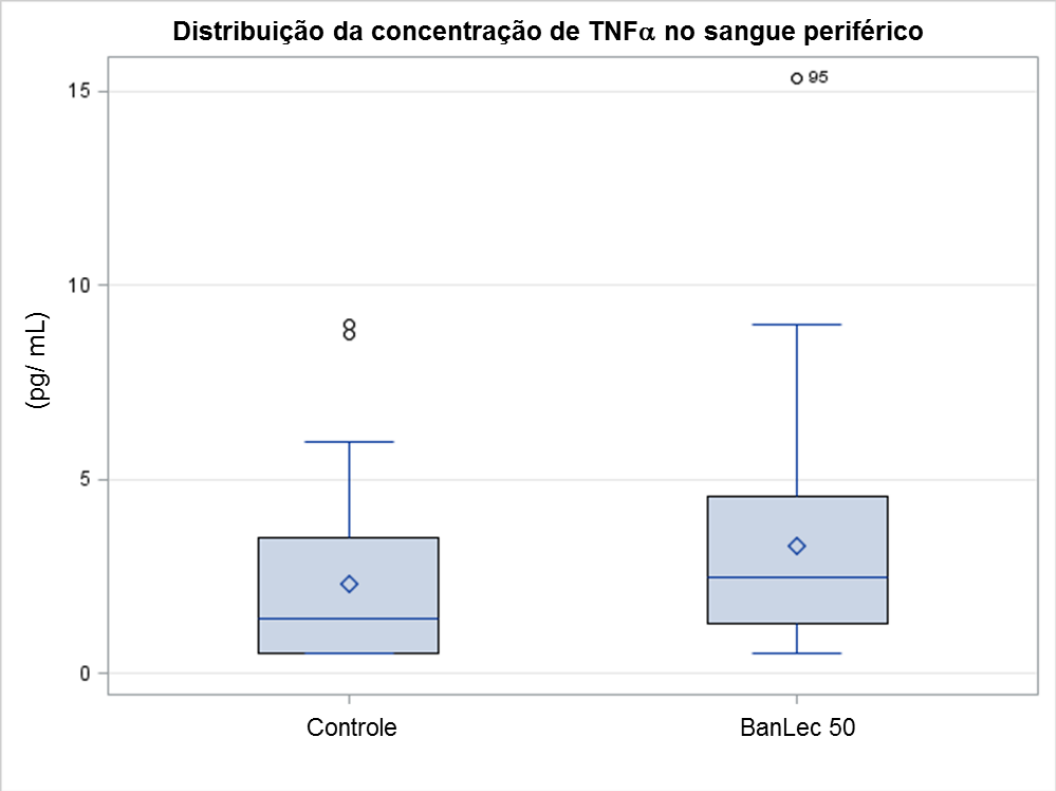

Figura 18. Distribuição da concentração de TNFα no sangue periférico de camundongos BALB/c do grupo Controle e BanLec 50, utilizando o teste de comparação de médias Tukey. As barras acima da caixa indicam os maiores valores observados para TNFα.

CHEVREL et. al (2002) analisaram culturas de sangue periférico de pacientes com artrite reumatoide que foram pré-incubados com o receptor solúvel de TNFα (sTNFR), também utilizado no tratamento de artrite reumatoide. Os autores demonstraram que em presença do receptor de IL-17 (IL-17R) na cultura de células ocorreu um diminuição na expressão de IL-6 em 16%, quando comparado às células somente estimuladas com sTNFR. Portanto, uma vez que o efeito da combinação de IL-17 e TNFα ocasionou na diminuição de produção de IL-6, os autores sugerem uma terapia combinada de sTNFR e IL-17R para diminuir a severidade da doença. Contudo, uma produção persistente de TNFα pode levar a perda de apetite e consequentemente à caquexia (SILVA, 2006). No nosso estudo, apesar do aumento de TNFα não houve perda significativa de peso dos animais, inclusive quando comparamos os animais do grupo BanLec 50 com o grupo Controle (Figura 19). As medições foram feitas a cada dois dias, sendo tomadas pelo menos um dia antes do início do experimento e concluídas no dia em que os animais foram eutanasiados.

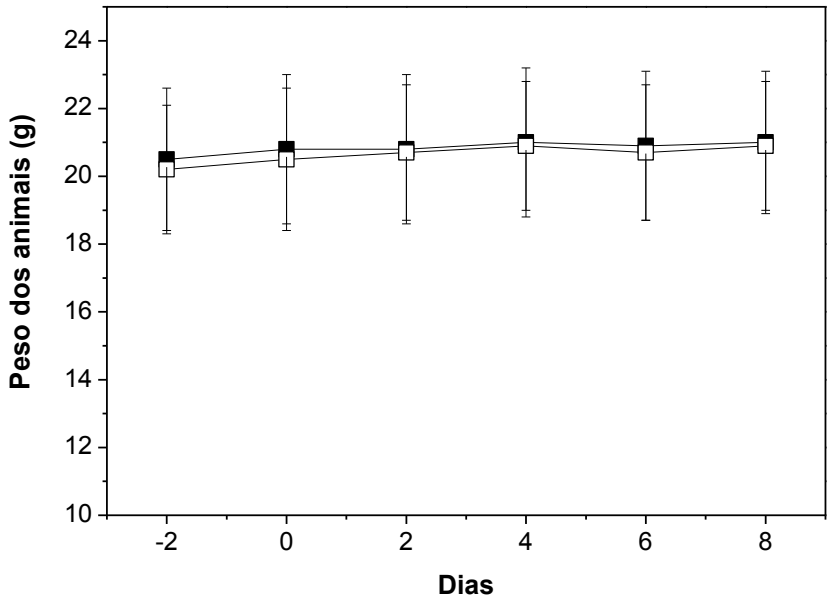

Figura 19. Peso dos animais do grupo BanLec 50 (□) e animais do grupo Controle (■). As medições foram feitas dois dias antes do início do experimento e até a eutanásia do animal. Foi utilizado o teste de comparação de médias Tukey para avaliação de diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$), as barras indicam o desvio padrão.

Várias lectinas de plantas tem comprovada ação imunomoduladora afetando o sistema imune através da liberação de citocinas. Esplenócitos de camundongos estimulados com ArtinM, a lectina extraída da semente de jaca (*Artocarpus heterophyllus*), tiveram a produção de IL-10 e IFNγ induzidas (CARDOSO et al., 2011). De forma similar, as lectinas Cramoll, extraída de *Cratylia mollis* (DE MELO et al., 2010), da Conbr, extraída do feijão *Canavalia brasiliensis* (TEIXEIRA et al., 2006), da ConA, extraída do feijão *Canavalia ensiformis* (MURAILLE et al., 1999) e da ASA-I, extraída do alho (*Alium sativum* - DONG et al., 2011) também produziram respostas imunes com produção de citocinas. O estímulo de lectinas em outras células também produziu esse tipo de resposta, como é o caso da DrosL, lectina extraída de *Dioclea rostrata* (REIS et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2009) e a PHA extraída do feijão comum *Phaseolus vulgaris* (MURAILLE et al., 1999).

Embora muitos desses estudos tenham utilizado lectinas de plantas comestíveis, como é o caso daquelas extraídas do feijão, existem poucos estudos relacionando o potencial imunomodulatório de lectinas presentes em frutos. Uma vez que são alimentos consumidos crus, ou são minimamente processados, é muito mais provável que a lectina presente nos frutos depois de ingerida por via oral preserve a sua forma nativa quando comparadas às lectinas de outros alimentos que

necessitem de algum processamento antes do consumo, como por exemplo, o cozimento.

Nesse sentido, é importante ressaltar o estudo da lectina extraída da polpa de bananas, BanLec. O potencial imunomodulador dessa lectina já havia sido apontado em alguns ensaios *in vitro* (WONG; NG, 2006; GAVROVIC-JANKULOVIC et al., 2008; CHEUNG et al., 2009; SWANSON et al., 2010; STOJANOVIC et al., 2010) e *in vivo* (DIMITRIJEVIC et al., 2012), ficando evidente diante que a resposta gerada por BanLec é dependente da população celular estudada. O estudo *in vivo* utilizando BanLec recombinante descrito por DIMITRIJEVIC et al. (2012) foi muito importante porque os autores confirmaram sua estabilidade, demonstrando que essa proteína chega intacta ao intestino, interagindo com células desse órgão. No entanto, não haviam sido analisados os efeitos dessas interações em linfócitos T e citocinas, que são importantes na resposta imune do indivíduo. Nesse sentido, o presente trabalho trouxe informações que preencheram essa lacuna.

3.5. CONCLUSÕES

Nesse estudo, foi possível definir uma dose em que os efeitos imunomoduladores gerados por BanLec natural foram observados em células do sangue periférico e timo dos camundongos que receberam essa lectina por via oral. Além disso, corroborando dados da literatura, foi constatado que a resposta gerada é dose-dependente, uma vez que obtivemos respostas diferentes quando foram testadas três diferentes doses de BanLec.

Além disso, foram demonstradas alterações em linfócitos T e citocinas no sangue periférico e timo dos animais tratados com BanLec, como aumento de linfócitos T CD4 no timo e modulação de algumas citocinas pró e anti-inflamatórias no sangue periférico. Desse modo, o conjunto de dados aponta para um efeito mais protetor e ativador do que patogênico, a despeito da modulação de citocinas pró inflamatórias.

Diante dessas análises podemos concluir que a BanLec extraída da polpa de bananas da cultivar Nanicão tem importante potencial imunomodulador, capaz de promover importantes alterações no sistema imune dos animais após a administração por via oral.

3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B; et al. **Molecular biology of the cell.** 4ª Edição: Garland Science, 2002.

ARNDT, R.; KEESER, D. Impairment of the immune system by HIV infection. **Z. Hautkr,** vol. 64, n° 5, 353-363, 1989.

AURORE, G.; PARFAIT, B.; FAHRASMANE, L. Bananas, raw materials for making processed food products. **Trends in Food Science & Technology,** pp. 1-13, 2008.

BETTELLI, E.; et. al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature,** vol. 441, pp. 235-238, 2006.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Molecular Immunology**, vol. 40, pp. 845-59, 2004.

BIOTÉRIO DE PRODUÇÃO E EXPERIMENTAÇÃO DA FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS E DO INSTITUTO DE QUIMÍCA. Disponível em: http://www.usp.br/bioterio/Artigos/normas_do_bioterio.pdf. Acesso em: 18 nov. 2014.

BISELLI, R.; MATRICARDI, P.M.; D'AMELIO, R.; FATTOROSSI, A. Multiparametric flow cytometric analysis of the kinetics of surface molecule expression after polyclonal activation of human peripheral blood T lymphocytes. **Scand J Immunol,** vol. 35, pp. 439-447, 1992.

CARDOSO, M.R.; et al. ArtinM, a d-mannose-binding lectina from Artocarpus integrifolia, plays a potente adjuvante and immunostimulatory role in immunization against Neospora caninum. **Vaccine**, vol. 29, nº 49, pp. 9183-9193, 2011.

CHEUNG, A.H.K.; WONG, J.H.; NG, T.B. Musa acuminata (Del Monte banana) lectin is a fructose-binding lectin with cytokine-inducing activity. **International Journal of Phytotherapy & Phytopharmacology**, vol. 16, nº 6-7, pp. 594-600, 2009.

CHEVREL, G.; GARNERO, P.; MIOSSEC, P. Addition of interleukin 1 (IL1) and IL17 soluble receptors to a tumour necrosis factor a soluble receptor more effectively reduces the production of IL6 and macrophage inhibitory protein-3a and increases that of collagen in an in vitro model of rheumatoid synoviocyte activation. **Ann. Rheum. Dis.**, vol. 61, pp. 730-733, 2002.

COSULICH, M.E.; RUBARTELLI, A.; RISSO, A.; COZZOLINO, F.; BARGELLESI, A. Functional characterization of an antigen involved in an early step of T cell activation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, vol. 84, nº 12, pp. 4205-4209, 1987.

DAWSON, R.M.C.; ELLIOTT, D.C.; ELLIOTT, W.H.; JONES, K.M. **Data for biochemical research**. 2ª Edição: Oxford University Press, 1969.

DIMITRIJEVIC, R.; STOJANOVIC, M.; MICIC, M.; DIMITRIJEVIC, Lj.; GAVROVIC-JANKULOVIC, M. Recombinant banana lectin as mucosal immunostimulator. **Journal of Functional Foods**, vol. 4, pp. 636-641, 2012.

DE MELO, C.M.; et al. Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. **Phytother. Res.**, vol 24, nº 11, pp. 1631-1636, 2010.

DONG, Q.; et al. Stimulation of IFN-gamma production by garlic lectin in mouse spleen cells: involvement of IL-12 via activation of p38 MAPK and ERK in macrophages. **Phytomedicine**, vol 18, nº 4, pp. 309-316, 2011.

FECCI, P.E.; et al. Increased regulatory T-cell fraction amidst a diminished CD4 compartment explains cellular immune defects in patients with malignant glioma. **Cancer Res.,** vol. 66, nº 6, pp. 3294-3302, 2006.

FIGUEIREDO, J.G.; et al. Pharmacological analysis of the neutrophil migration induced by D. rostrata lectin: involvement of cytokines and nitric oxide. **Toxicon.**, vol. 54, nº 6, pp. 736-744, 2009.

GARCIA, K.C.; TEYTON, L.; WILSON, I.A. Structural basis of T cell recognition. **Annual Review of Immunology**, vol. 17, pp. 369–397, 1999.

GOBER, H.J.; KISTOWSKA, M.; ANGMAN, L.; JEN¨O, P.; MORI, L.; DE LIBERO, G. Human T cell receptor $\gamma\delta$ cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. **Journal of Experimental Medicine**, vol. 197, nº. 2, pp. 163–168, 2003.

GOLDSTEIN, I.J. et al. Carbohydrate binding properties of banana (Musa acuminata) lectin II. Binding of laminaribiose oligosaccharides and β-glucans containing β1,6-glucosyl end groups. **Eur. J. Biochem**., vol. 268, pp. 2616-2619, 2001.

GUPTA, S. Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in T cells from aged humans: a role of TNFR-I and downstream signaling molecules. **Exp. Gerontol.**, vol. 37, pp. 293-299, 2002.

HARRINGTON, L.E.; et al. Interleukin 17–producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. **Nature Immunology**, vol. 6, nº 11, pp. 1123-1132, 2005.

HOLDERNESS, J.; HEDGES, J.F.; et al. Response of γδ T cells to plant-derived tannins. **Critical Reviews in Immunology**,vol. 28, nº 5, pp. 377–402, 2008.

HOSTANSKA, K.; HAJTO, T.; SPAGNOLI, G.C.; FISCHER, J.; LENTZEN, H.; HERRMANN, R. A plant lectin derived from *Viscum album* induces cytokine gene expression and protein production in cultures of human peripheral blood mononuclear cells. **Nat Immun**., vol. 14, nº 5-6, pp. 295-304, 1995.

HOT, A.; LENIEF, V.; CAZALIS, M.A.; MIOSSEC, P. Pathogenic role of IL-17 in endothelial dysfunction, a link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis. **Ann. Rheum. Dis.,** vol. 69, pp. 44-45, 2010.

HUGHES, M.A.; PARISI, M.; GROSSMAN, S.; KLEINBERG, L. Primary brain tumors treated with steroids and radiotherapy: low CD4 counts and risk of infection. **Int J Radiat Oncol Biol Phys,** vol. 62, pp. 1423-1426, 2005.

IVANOV, I.I.; et al. The Orphan Nuclear Receptor RORγt directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. **Cell**, vol. 126, pp. 1121-1133, 2006.

JANEWAY, C.A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology**, vol. 20, pp. 197–216, 2002.

JIAO, Y; et al. Longitudinal changes in peripheral blood NK cells during the first year of HIV-1 infection in $CD4_{Low}$ and $CD4_{High}$ patient groups. **Aids Research and Human Retroviruses,** vol. 30, pp. 1-8, 2014.

KAUFMANN, S.H.E. Gamma/delta and other unconventional T lymphocytes: What do they see and what do they do? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 93, nº 6, pp. 2272-2279, 1996.

KISHIMOTO, T. IL-6: from its discovery to clinical applications. **Int. Immunol.**, vol. 22, pp. 347-352, 2010.

KOSHTE, V.L.; AALBERS, M.; CALKHOVEN, P.G.; AALBERSE, R.C. The potent IgG4-inducing antigen in banana is a mannose-binding lectin, BanLec-I. **Int. Arch. Allergy Immunol.** vol. 97, nº 1, pp. 17–24, 1992.

KOSHTE, V.L.; VAN DIJK, W.; VAN DER STELT, M.E.; AALBERSE, R.C. Isolation and characterization of BanLec-I, a mannoside-binding lectin from Musa paradisiac (banana). **Biochem. J**., vol. 272, pp. 721-726, 1990.

MANGAN, P.R., et. al. Transforming growth factor-beta induces development of the Th17 lineage. ***Nature***, vol. 441, pp. 231-234, 2006.

MARATHIAS, K.; PINTO, C.; RODBERG, G.; PREFFER, F.; WONG, J.; KRADIN, F. The T cell antigen receptor CD3:CD4 molecular complex is diminished on the surface of pulmonary lymphocytes. **American Journal of Pathology**, vol. 145, nº 5, pp. 1219-1227, 1994.

MASIHI, K.N. Immunomodulatory agents for prophylaxis and therapy of infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, vol. 14, pp. 181–191, 2000.

MCDEVITT, H.O. Discovering the role of the major histocompatibility complex in the immune response. **Annual Reviews in Immunology**, vol. 18, pp. 1–17, 2000.

MCGEACHY et. al. TGF-b and IL-6 drive the production of IL-16 and IL-10 by T cells and restrain Th17 cell-mediated pathology. ***Nat. Immunol.*****,** vol. 8, pp. 1390-1397, 2007.

MO, H. et al. Carbohydrate binding properties of banana (Musa acuminata) lectin I. Novel recognition of internal α1,3-linked glucosyl residues. **Eur. J. Biochem**., vol. 268, pp. 2609-2615, 2001.

MURAILLE, E.; PAJAK, B.; URBAIN, J; LEO, O. Carbohydrate-bearing cell surface receptors involved in innate immunity: Interleukin-12 induction by nonmitogenic lectins. **Cell. Immunol.**, vol 191, nº 1, pp. 1-9, 1999.

NAKAMURA-TSURUTA, S.; KISHIMOTO, Y.; NISHIMURA, T; SUDA, Y. One-step purification of lectins from banana pulp using sugar-immobilized gold nano-particles. **J. Biochem**., vol. 143, pp. 833–839, 2008.

PENDER, M.P. CD8+ T-cell deficiency, Epstein-Barr virus infection, Vitamin D deficiency, and steps to autoimmunity: A unifying hypothesis. **Autoimmune Diseases**, vol. 2012, pp. 1-16, 2012.

PEUMANS, W.J.; PROOST, P.; SWENNEN, R.L.; VAN DAMME, E.J.M. The abundant class III chitinase homolog in young developing banana fruits behaves as a transient vegetative storage protein and most probably serves as an important supply of amino acids for the synthesis of ripening-associated proteins. **Plant Physiol.**,vol. 130, pp. 1063-1072, 2002.

PEUMANS, W.J.; ZHANG W. et al. Fruit-specific lectin from banana and plantain. **Planta**, vol. 211, pp. 546-554, 2000.

PUSZTAI, A. Dietary lectins are metabolic signals for the gut and modulate immune and hormonal functions. **Eur. J. Clin. Nutr.**, vol. 47, pp. 691-699, 1993.

QUESNIAUX, V.; RYFFEL, B.; DI PADOVA, F. **Th17 cells: Role in inflammation and autoimune disease.** Birkhäuser, 2009.

REIS, E.A.; et al. Potential immunomodulatory effects of plant lectins in Schistosoma mansoni infection. **Acta Trop.**, vol. 108, nº 2-3, pp. 160-165, 2008.

ROTHE, J.; GEHR, G.; LOETSCHER, H.; LESSLAUER, W. Tumor necrosis factor receptors - structure and function. **Immunol. Res.**, vol. 11, pp. 81–90, 1992.

SILVA, M.P.N. Síndrome da anorexia-caquexia em portadores de câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, vol 52, nº 1, pp. 59-77, 2006.

SINGH, D.D. et al. Unusual sugar specificity of banana lectin from Musa paradisiaca and its probable evolutionary origin. Crystallographic and modelling studies. **Glycobiology**, vol. 15, nº 10, pp. 1025-1032, 2005.

STANILOVA, S.A.; DOBREVA, Z.G.; SLAVOV, E.S.; MITEVA, L.D. C3 binding glycoprotein from *Cuscuta europea* induced different cytokine profiles from human PBMC compared to other plant and bacterial immunomodulators. **International Immunopharmacology**, vol. 5, pp. 723-734, 2005.

STOJANOVIC, M.A. In vitro stimulation of Balb/c and C57 BL/6 splenocytes by a recombinantly produced banana lectin isoform results in both a proliferation of T cells and an increased secretion of interferon-gamma. **International Immunopharmacology**, vol. 10, pp. 120–129, 2010.

STOW, J.L.; LOW, P.C.; OFFENHAUSER, C.; SANGERMANI, D. Cytokine secretion in macrophages and other cells: pathways and mediators. **Immunobiology**, vol. 214, pp. 601-612, 2009.

SU, D.; SHEN, M.; LI, X.; SUN, L. Roles of γδ T cells in the pathogenesis of autoimmune diseases. **Clinical and Developmental Immunology**, vol. 2013, pp. 1-6, 2013.

TEIXEIRA, C.R.; et al. Potential of KM+ lectina in immunization against Leishmania amazonensis infection. **Vaccine**, vol. 25, nº 15, pp. 3001-3008, 2006.

TURNER, M.D.; NEDJAI, B.; HURST, T.; PENNINGTON, D.J. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2014 (in press).

VANHECKE, D.; LECLERCQ, G.; PLUM, J.; VANDERKERCKHOVE, B. Characterization of distinct stages during the differentiation of human CD69+CD3+ thymocytes and identification of thymic emigrants. **J. Immunol.**, vol. 155, nº 4, pp. 1862-1872, 1995.

XIE, G.; SCHEPETKIN, I.A.; QUINN, M.T. Immunomodulatory activity of acidic polysaccharides isolated from *Tanacetum vulgare* L. **International Immunopharmacology**, vol. 7, pp. 1639-1650, 2007.

WEARNE, K.; WINTER, H.C.; GOLDSTEIN, I.J. Isolation of a banana lectin – a practical scale procedure from ripe banana fruit. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, vol. 43, pp. 285-292, 2013.

WYNN, T.A. Th-17: a giant step from Th1 and Th2. **Nature Immunology**, vol. 6, nº 11, pp. 1069-1070, 2005.

WONG, J.H.; NG, T.B. Purification of a trypsin-stable lectin with antiproliferative and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** Vol. 301, pp. 545–550, 2003.

CAPÍTULO IV
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Foram realizadas análises que nos permitiram conhecer melhor o perfil de BanLec nos extratos de banana, e embora a quantificação utilizando anticorpo específico não tenha sido possível através da técnica de ELISA, os ensaios de hemaglutinação apontaram para um maior teor de BanLec na banana madura quando comparado à banana verde. Os ensaios conduzidos com bananas da cultivar Nanicão que foram submetidas a tratamento com baixa temperatura apresentou títulos de hemaglutinação menores quando comparados aos títulos de hemaglutinação de bananas Nanicão tratadas com 1-MCP, embora não tenha sido possível observar diferenças entre os grupos tratados com os respectivos controles. Ainda, diante dos dados apresentados, parece que BanLec não está presente na polpa da cultivar Figo, e até o momento, não existem relatos de cultivares de bananas que não apresentem essa proteína.

O sequenciamento de BanLec utilizando as bandas recortadas do gel de eletroforese mostrou duas proteínas principais com características de lectina, contendo 141 aminoácidos e com massas moleculares de 14,7 KDa e 14,6 KDa, resultados que são compatíveis com dados da literatura, mostrando que foram encontradas duas diferentes subunidades de BanLec nessas amostras.

A administração por via oral de BanLec a camundongos comprovou o efeito modulador dessa proteína. Até o momento, não haviam sido feitas mensurações de linfócitos T, B e citocinas de forma sistêmica; portanto, os dados obtidos permitem concluir que essa proteína tem grande potencial imunomodulador, alterando populações de linfócitos T e importantes citocinas da resposta imunológica do indivíduo.

Além do sangue periférico e timo, segmentos do intestino delgado (jejuno e íleo) também foram coletados após eutanásia dos animais, os quais estão preservados em parafina. O estudo *in vivo* conduzido por DIMITRIJEVIC et al. (2012) confirmou a interação dessa proteína com a mucosa intestinal, entretanto, não foram analisados os linfócitos T e citocinas nesse material. Uma vez após administração por via oral o primeiro contato com BanLec se dá no trato gastrointestinal, e no intestino delgado irão acontecer os primeiros eventos de natureza imunológica,

estão programadas análises desses parâmetros imunológicos no jejuno e íleo através de imunohistoquímica, para avaliar se a interação de BanLec com a mucosa intestinal pode causar efeitos imunomoduladores similares aos observados no sangue periférico e timo dos camundongos.

ANEXO 1: Informações gerais sobre a ração administrada aos camundongos durante o experimento *in vivo.*

NUVILAB CR-1 IRRADIADA

Esterelização por Irradiação Gama

Composição do produto
Milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, óleo vegetal, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, niacina, pantotenato de cálcio, ácido fólico, biotina, cloreto de colina, sulfato de ferro, monóxido de manganês, óxido de zinco, sulfato de cobre, iodato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, lisina, metionina, BHT.

níveis de garantia por quilograma do produto

Umidade (máx.)	125 g/kg
Proteína Bruta (mín.)	220 g/kg
Extrato Etéreo (mín.)	50 g/kg
Matéria Mineral (máx.)	90 g/kg
Matéria Fibrosa (máx.)	70 g/kg
Cálcio (mín - máx.)	10 a 14 g/kg
Fósforo (mín.)	6.000 mg/kg

Vitaminas
vitamina A (mín) 13.000 UI/kg; vitamina D3 (mín) 2.000 UI/kg; vitamina E (mín) 34 UI/kg; vitamina K3 (mín) 3 mg/kg; vitamina B1 (mín) 5 mg/kg; vitamina B2 (mín) 6 mg/kg; vitamina B6 (mín) 7 mg/kg; vitamina B12 (mín) 22 mcg/kg; niacina (mín) 60 mg/kg; ácido pantotênico (mín) 21 mg/kg; ácido fólico (mín) 1 mg/kg; biotina (mín) 0,05 mg/kg; colina (mín) 1.900 mg/kg.
Minerais: sódio (mín) 2.700 mg/kg; ferro (mín) 50 mg/kg; manganês (mín) 60 mg/kg; zinco (mín) 60 mg/kg; cobre (mín) 10 mg/kg; iodo (mín) 2 mg/kg; selênio (mín) 0,05 mg/kg, cobalto (mín) 1,5 mg/kg; flúor (max) 60 mg/kg.
Aminoácidos: Lisina (mín) 12 g/kg; metionina (mín) 4.000 mg/kg.
Aditivos: BHT 100 mg/kg.

Indicação
Ração irradiada para camundongos e ratos de laboratório.

Uso
Administração à vontade através de comedouros suspensos.

Conservação
Conservar o produto em ambiente seco e arejado, sobre estrados, evitando-se luz e calor excessivos.

Apresentação
Peletizada (ou farelada sob consulta).

Validade: 06 meses após a data de fabricação.

Informações gerais sobre a alimentação

Forma de administração da ração : À vontade

Ingestão média diária de ração
Camundongos: de 4 a 6 g.
Ratos: de 19 a 30 g.

Consumo médio diário de ração
Camundongos: de 7 a 12 g.
Ratos: de 30 a 45 g.
(variável em função da apetibilidade da ração, da intensidade da compactação e diâmetro dos grânulos).

Consumo médio diário de água
Camundongos: 6 ml.
Ratos: de 35 a 40 ml.

Modo de fornecimento de água
Bebedouros tipo mamadeira.

Tipo de alimento
Camundongos: ração balanceada para camundongos (exclusivamente).
Ratos: ração balanceada para ratos (exclusivamente)

Apresentação da ração
Grânulos com 15 a 16 mm de diâmetro e 30 a 10 mm de comprimento.

Modo de fornecimento
Camundongos: através de tampas comedouros, confeccionadas com arames, dispostos paralelamente e distantes entre si por 6, 9 a 7,1 mm.
Ratos: através de tampas comedouros, confeccionadas com arames, dispostos paralelamente e distantes entre si por 9 a 11 mm.

2

Nuvital

ANEXO 2: Estudo piloto: Protocolo de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP nº 416.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 622013

C E R T I F I C A D O

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP) CERTIFICA que o Projeto de Pesquisa "**Efeito das cultivares, tratamentos pós-colheita e do processamento nos teores de 'BanLec', uma lectina com ação imunomoduladora e anti-viral presente na polpa de bananas.**" (Protocolo CEUA/FCF/416), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Ana Claudia Miranda Brito Sansone**, sob orientação/supervisão do(a) **Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de 13 de maio de 2013.

São Paulo, 11 de junho de 2013.

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3622 / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: ceuafcf@usp.br

ANEXO 3: Estudo principal: Protocolo de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP nº 448.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF **24.2014-P448**

C E R T I F I C A D O

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa "**Efeito das cultivares, tratamentos pós-colheita e do processamento nos teores de 'BanLec', uma lectina com ação imunomoduladora e anti-viral presente na polpa de bananas**" (Protocolo CEUA/FCF/448), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Ana Claudia Miranda Brito Sansone**, sob orientação do(a) **Prof. Dr. João Roberto Oliveira do Nascimento**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de **21 de fevereiro de 2014**. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 18 de março de 2014.

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A, Cidade Universitária, CEP 05508-900, São Paulo, SP
Telefone: (11) 3091 3622 - e-mail: ceuafcf@usp.br

ANEXO 4: Sequenciamento de banda de gel de eletroforese para identificação de BanLec

Acesso no bando de dados	Descrição da proteína identificada	*Score*	*Coverage*	Proteinas	Peptídeos únicos	Peptideos	PSMs	Amino-ácidos	Massa Molecular [kDa]	pI
Q8L5H4	Lectin OS=Musa acuminata PE=1 SV=1 - [Q8L5H4_MUSAC]	473,05	79,43	3	6	7	114	141	14,7	6,79
O22321	Ripening-associated protein OS=Musa acuminata PE=1 SV=2 - [O22321_MUSAC]	383,80	50,35	2	4	5	83	141	14,6	7,49
M0TS72	Uncharacterized protein OS=Musa acuminata subsp. malaccensis PE=4 SV=1 - [M0TS72_MUSAM]	64,83	9,90	1	1	1	19	192	20,5	8,95
E9NX13	Lectin OS=Musa acuminata AAA Group PE=2 SV=1 - [E9NX13_MUSAC]	6,53	24,82	1	2	2	2	141	14,7	6,52
M0SLP0	Uncharacterized protein OS=Musa acuminata subsp. malaccensis PE=4 SV=1 - [M0SLP0_MUSAM]	3,35	1,11	1	1	1	1	1166	131,0	5,50
M0ST63	Uncharacterized protein OS=Musa acuminata subsp. malaccensis PE=4 SV=1 - [M0ST63_MUSAM]	3,31	18,52	1	1	1	1	81	8,2	9,99
E5FY32	Phosphatidic acid phosphatase-like protein OS=Musa acuminata AAA Group PE=2 SV=1 - [E5FY32_MUSAC]	3,14	5,83	2	1	1	1	309	35,6	9,60
M0S2V5	Uncharacterized protein OS=Musa acuminata subsp. malaccensis PE=4 SV=1 - [M0S2V5_MUSAM]	3,07	1,81	1	1	1	1	830	89,6	7,28
M0TVG0	Uncharacterized protein OS=Musa acuminata subsp. malaccensis PE=4 SV=1 - [M0TVG0_MUSAM]	3,04	2,32	1	1	1	1	691	73,8	6,57
M0U573	Uncharacterized protein OS=Musa acuminata subsp. malaccensis PE=4 SV=1 - [M0U573_MUSAM]	2,95	1,19	1	1	1	1	1593	177,8	6,18
M0SCD5	Uncharacterized protein OS=Musa acuminata subsp. malaccensis PE=4 SV=1 - [M0SCD5_MUSAM]	0,00	2,06	1	1	1	1	388	42,8	9,80

* A busca foi feita no banco de dados Musaceae Uniprot

ANEXO 5: Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO 6: Ficha do aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9131 - 7361566/1 - Ana Cláudia Miranda Brito Sansone

Email:	anasansone@usp.br
Data de Nascimento:	15/02/1980
Cédula de Identidade:	RG - 32.761.526-7 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico - Universidade São Judas Tadeu - São Paulo - Brasil - 2004

Curso:	Doutorado Direto
Programa:	Ciência dos Alimentos
Área:	Bromatologia
Data de Matrícula:	02/08/2010
Início da Contagem de Prazo:	02/08/2010
Data Limite para o Depósito:	01/12/2014
Orientador:	Prof(a). Dr(a). João Roberto Oliveira do Nascimento - 02/08/2010 até o presente. E.Mail: jronasci@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 02/08/2010
Prorrogação:	120 dias Período de 02/08/2014 a 30/11/2014
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 16/10/2012
Data do Depósito do Trabalho:	06/11/2014
Título do Trabalho:	"."
Data Máxima para Aprovação da Banca:	05/01/2015
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Ingressou no Doutorado Direto em 02/08/2010 Prorrogação em 07/07/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013)
Última ocorrência: Prorrogação em 07/07/2014
Impresso em: 19/11/14 10:29:07

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9131 - 7361566/1 - Ana Cláudia Miranda Brito Sansone

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5719-2/2	Trato Gastrointestinal: Imunomodulação da Colonização e Infecção Bacteriana	04/03/2011	16/06/2011	90	6	98	A	N	Concluída
BTC5743-2/5	Seminários Gerais (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	16/03/2011	28/06/2011	30	2	100	A	N	Concluída
EDM5791-5/6	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	16/03/2011	30/06/2011	120	8	100	A	N	Concluída
FBA5870-6/2	Tópicos em Ciência dos Alimentos e Nutrição I	05/04/2011	13/06/2011	30	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBA5741-3/1	Química e Bioquímica de Alimentos I	18/08/2011	21/09/2011	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5742-2/1	Química e Bioquímica de Alimentos II	06/10/2011	09/11/2011	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5900-2/1	Biomodelos Experimentais Aplicados na Avaliação de Alimentos	11/06/2013	01/07/2013	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	25	26
Estágios:			
Total:	0	25	26

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Prorrogação em 07/07/2014
Impresso em: 19/11/14 10:29:08

9131 - 7361566/1 - Ana Cláudia Miranda Brito Sansone

Comissão julgadora:

NUSP	Nome	Vínculo	Função
1034406	João Roberto Oliveira do Nascimento	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Prorrogação em 07/07/2014
Impresso em: 19/11/14 10:29:08