

## **BOL: A LECTINA EXTRAÍDA DE BRASSICA OLERACEA SSP. BOTRYTIS E SEUS EFEITOS SOBRE MACRÓFAGOS**

Christiane Eliza Motta Duarte<sup>1</sup>, Monise Viana Abranches<sup>2</sup>,  
Patrick Fernandes Silva<sup>3</sup>, Leandro Licursi de Oliveira<sup>4</sup>

**Resumo:** *Lectinas são proteínas amplamente difundidas na natureza, sendo encontradas em animais, plantas e microrganismos. Essas proteínas tem a característica de se ligarem seletiva e reversivelmente a carboidratos. As lectinas estão envolvidas em diversos fenômenos biológicos como endocitose, tráfego intracelular de glicoproteínas, regulação de migração, adesão celular, fagocitose e no processo de invasão por patógenos, entre outras funções. Existem várias evidências de que lectinas possuem ação sobre o sistema imunológico. Algumas induzem a proliferação de linfócitos, outras induzem a migração e ativação de neutrófilos, podem promover a degranulação de mastócitos e a produção de IL-12 por macrófagos, além do efeito protetor in vivo contra infecções. Recentemente identificamos e caracterizamos uma nova lectina isolada de *Brassica oleracea* ssp. *botrytis* denominada BOL. Ensaios preliminares demonstraram que a fagocitose e a produção de mediadores inflamatórios por macrófagos foram estimuladas na presença da lectina BOL. Desta maneira, essa lectina pode ser explorada como possível agente imunestimulador capaz de auxiliar na ativação da resposta imune, favorecendo a remoção de agentes não próprios.*

**Palavras-chave:** *Agente imunomodulador, couve-flor, mediadores inflamatórios, proteína de ligação a carboidrato*

---

<sup>1</sup> Doutoranda em Biologia Celular – Universidade Federal de Viçosa. e-mail: [christiane.duarte@ufv.br](mailto:christiane.duarte@ufv.br)

<sup>2</sup> Professora do Departamento de Nutrição e Saúde – Universidade Federal de Viçosa. e-mail: [monise.abranches@ufv.br](mailto:monise.abranches@ufv.br)

<sup>3</sup> Mestrando em Biologia Celular – Universidade Federal de Viçosa. e-mail: [patrick.fernandes@ufv.br](mailto:patrick.fernandes@ufv.br)

<sup>4</sup> Professor do Departamento de Biologia Geral – Universidade Federal de Viçosa. e-mail: [leandro.licursi@ufv.br](mailto:leandro.licursi@ufv.br)

**Abstract:** *Lectins are ubiquitous in the nature, being found in animals, plants, and microorganisms. These proteins have the characteristic to bind selectively and reversibly to carbohydrates. Lectins are involved in various biological phenomena such as endocytosis, intracellular traffic of glycoproteins, regulating migration, cell adhesion, phagocytosis and pathogen invasion process, among other functions. There is ample evidence that lectins have action on the immune system. Some induce proliferation of lymphocytes, others induce migration and activation of neutrophils, can promote degranulation of mast cells and the production of Interleucin-12 by macrophages, in addition to the protective effect in vivo against infection. Recently we identified and characterized a novel lectin isolated from Brassica oleracea ssp. botrytis called BOL. Preliminary tests have shown that the phagocytosis and the production of inflammatory mediators by macrophages were stimulated in the presence of the BOL lectin. Thus, this lectin can be explored as a possible immunostimulating agent capable of facilitating activation of the immune response, promoting the removal of foreign agents.*

**Keywords:** *Carbohydrate binding protein, cauliflower, inflammatory mediators, immunomodulatory agent*

## Introdução

Lectinas são proteínas amplamente difundidas na natureza, sendo encontradas desde seres unicelulares até organismos superiores (De Schutter and Van Damme, 2015). Essas proteínas tem a característica de se ligarem seletiva e reversivelmente a carboidratos e estão envolvidas em diversos fenômenos biológicos como endocitose, tráfego intracelular de glicoproteínas, regulação de migração, adesão celular, fagocitose e no processo de invasão por patógenos. Existem várias evidências de que lectinas possuem ação sobre o sistema imunológico. Algumas induzem a proliferação de linfócitos, outras induzem a migração e ativação de neutrófilos, podem promover a degranulação de mastócitos e a produção de IL-12 por macrófagos, além do efeito protetor in vivo contra infecções. Essas proteínas são capazes de

estimular a resposta imune inata, direcionar a eliminação de agentes estranhos ao organismo e auxiliar na fagocitose por macrófagos e células dendríticas (Ghazarian et al. 2011). O isolamento e caracterização de novas lectinas e a avaliação de seus efeitos sobre o sistema imunológico têm sido alvo de diversos estudos em decorrência da ampla aplicabilidade desse tipo de pesquisa nas áreas biomédicas. Recentemente nosso grupo de pesquisa identificou e caracterizou uma nova lectina isolada de *Brassica oleracea* ssp. *botrytis* e aqui nós reportamos os ensaios iniciais para avaliação dos efeitos biológicos dessa proteína sobre a ativação de macrófagos.

### **Material e Métodos**

Floretes de couve-flor (*Brassica oleracea* ssp. *botrytis*) foram coletados, lavados em água corrente e processados em tampão PBS. O filtrado foi centrifugado e o sobrenadante submetido a três etapas de cromatografia para obtenção de uma fração purificada da lectina, denominada BOL. Macrófagos foram coletadas por laparotomia da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c pré-tratados com tioglicolato. Para avaliação da atividade fagocítica, a suspensão de células foi previamente incubada com diferentes concentrações da lectina seguida por uma incubação com o fungo *Pichia pastoris*. O material foi fixado e preparou-se lâminas para análise do número de macrófagos que fagocitaram o fungo. Os ensaios de produção de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) foram realizados através do estímulo dos macrófagos com diferentes concentrações de lectina e posterior avaliação dos níveis de nitritos e peróxido presentes no sobrenadante das culturas por meio de leituras de absorbância. A determinação estatística das diferenças entre as médias dos grupos experimentais foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Tukey. Diferenças com  $p < 0,05$  foram consideradas significativas.

## Resultados e Discussão

A fim de verificar, se BOL era capaz de atuar como agente imunestimulador, avaliou-se a capacidade de induzir a ativação de macrófagos mediada por essa lectina. Os macrófagos são a primeira linha de defesa na luta contra invasões microbianas e estão envolvidos na ativação tanto da resposta imune humoral como celular. O efeito da lectina de couve-flor sobre a atividade fagocítica de macrófagos peritoneais em células de levedura é mostrado nas Figs. 1A e 1B. A fagocitose foi aumentada ~ 2 vezes ( $p < 0,05$ ) em comparação com o grupo controle. BOL também induziu aumento significativo na produção de mediadores inflamatórios, em comparação com células não tratadas. Os resultados da produção de NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são mostrados nas Figs. 1C e 1D.

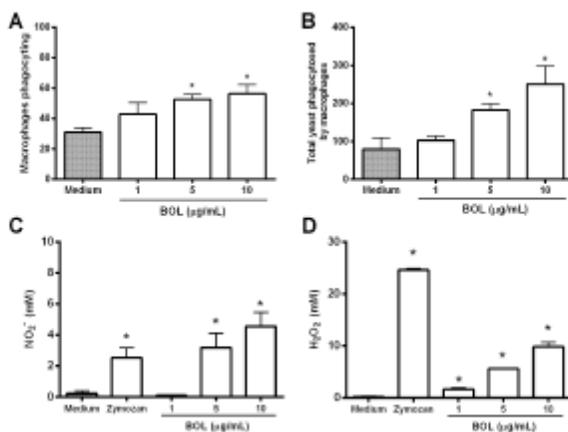


Figura 1 –Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram tratados com a lectina extraída de couve-flor. (A) Número de macrófagos que exibiram a fagocitose em cada uma das 200 células analisadas. (B) Índice fagocítico para os macrófagos analisados. (C) Produção de óxido nítrico pelos macrófagos. (D) Produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos. Os ensaios foram realizados em triplicatas; os resultados representam a média  $\pm$  SD de três experimentos independentes; \*  $P < 0,05$  comparado com o grupo controle.

O efeito imunomodulador desencadeado por BOL foi evidenciado por sua capacidade de estimular a fagocitose e a produção de mediadores inflamatórios pelos macrófagos peritoneais. Wong e Ng (2006) relataram que a lectina extraída de banana aumentou a produção de NO por macrófagos de maneira dose-dependente. Resultados semelhantes também foram observados em estudos com lectina de cebola (Prasanna, Venkatesh 2015). Mariano e colaboradores (2014) propuseram um possível mecanismo de estímulo de macrófagos. Eles usaram como modelo ArtinM, uma lectina de ligação a manose extraída de jaca. Essa lectina interage com receptores do tipo Toll de uma maneira dependente do reconhecimento de carboidratos, o que culmina em uma maior secreção de citocinas decorrente da ação do fator de transcrição nuclear NFkB. Várias outras lectinas de plantas exercem atividades imunomoduladoras que são iniciadas pela sua interação com glicanas presentes sobre a superfície de células imunitárias. Tal interação pode provocar uma transdução de sinal, culminar com produção de determinadas citocinas e induzir respostas imunes eficazes contra tumores ou infecções microbianas (Souza et al. 2013).

### **Conclusão**

A lectina isolada a partir de couve-flor pode atuar como agente imunomodulador. Os resultados preliminares apresentados aqui demonstraram que a fagocitose e a produção de mediadores inflamatórios por macrófagos foram estimuladas na presença de BOL. Desta maneira, essa lectina pode ser explorada como possível agente imunoestimulador capaz de auxiliar na ativação da resposta imune, favorecendo a remoção de agentes não próprios. Essa é uma atividade potencialmente explorável e abrirá espaço para novos estudos que irão incluir a elucidação da sequência completa de BOL, expressão heteróloga e produção em larga escala da proteína com subsequente investigação dos efeitos e mecanismos imunoestimulantes.

### **Agradecimentos**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro.

### **Referências Bibliográficas**

DE SCHUTTER, K.; VAN DAMME, E. J. Protein-Carbohydrate Interactions as Part of Plant Defense and Animal Immunity. *Molecules*, v. 20, n. 5, p. 9029-9053, 2015.

GHAZARIAN, H.; IDONI, B.; OPPENHEIMER, S. B. A glycobiology review: carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. *Acta Histochem*, v. 113, n. 3, p. 236-247, 2011.

MARIANO V.S.; ZORZETTO-FERNANDES, A.L.; SILVA, T. A.; RUAS, L. P.; NOHARA, L. L.; ALMEIDA, I. C. et al. Recognition of TLR2 N-Glycans: critical role in ArtinM immunomodulatory activity. *PLoS One*, v. 9, n. 6, e98512, 2014.

PRASANNA, K.; VENKATESH, Y.P. Characterization of onion lectin (*Allium cepa* agglutinin) as an immunomodulatory protein inducing Th1-type immune response in vitro. *Int Immunopharmacol*, v. 26, n. 2, p. 304-313, 2015.

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*, v. 30, n. 7, p. 641-657, 2013.

WANG, H.; GAO, J.; NG, T.B. A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 275, n. 3, p. 810-816, 2000.