

C 66912
R 13531259/04

R\$ 17,20

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

EFEITO DE LECTINAS VEGETAIS DE *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*, NA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E INTERAÇÃO COM CÉLULAS INFLAMATÓRIAS.

VERUSKA BEZERRA DE MENEZES ALENCAR

Tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro
Co-orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada
Co-orientador: Prof. Dr. Henri Debray

TESE
616.0/173
A355e
2003
ex. 21

FORTALEZA-CE
2003

UNIV. FEDERAL DO CEARÁ
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

A355e Alencar, Veruska Bezerra de Menezes

Efeito de lectinas vegetais de *pisum arvense*, *bauhinia variegata*, *arum maculatum* e *helianthus tuberosus*, na migração de neutrófilos e interação com células inflamatórias./ Veruska Bezerra de Menezes Alencar. – Fortaleza, 2003.

194 fs.: il.

Orientador: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina

1. Mediadores de inflamação 2. Teste de migração de leucócitos 3. Citometria de fluxo 4. Neutrófilos 5. Lectinas vegetais I. Ribeiro, Ronaldo de Albuquerque (Orient.) II. Título.

CDD 616.0473

EFEITO DE LECTINAS VEGETAIS *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus* NA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E INTERAÇÃO COM CÉLULAS INFLAMATÓRIAS.

Dissertação apresentada ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Farmacologia

VERUSKA BEZERRA DE MENEZES ALENCAR

Data da defesa: 26 de fevereiro de 2003

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro



Prof^a. Dra. Gerly Anne de Castro Brito

Prof^a. Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy



Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha

Prof^a. Dra. Helena Serra Azul Monteiro

*Dedico este trabalho a minha família,
pela compreensão, carinho e ajuda a mim endereçados
na realização deste.*

***Somos o que fazemos por nós!
Estamos onde nos colocamos!
Somos o capitão do barco do nosso destino.
Dirigimos nossa vida pelas nossas atitudes.
Criamos atitudes com aquilo que escolhemos acreditar.
E crenças, a gente muda quando quer!
(Luiz Antônio Gaspareto)***

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Ronaldo, por todo o tempo que estive em seu laboratório, pelo apoio e compreensão na minha trajetória, pelos pequenos detalhes que demonstram sua presença no trabalho e sua amizade. Agradeço ainda pela sua importante participação no meu processo de maturação.

Agradeço ao meu co-orientador Prof. Dr. Benildo, pela sua força, seu apoio e confiança depositados em mim, além de sua presteza sempre que precisei e seus conselhos, fatos estes, que foram importantes e decisivos na minha conduta frente aos desafios encontrados.

Agradeço ao meu co-orientador Prof. Dr. Henri Debray, pela acolhida em seu laboratório, por guiar meus primeiros passos na França, pela paciência quando eu ainda não sabia como expressar-me, pelas discussões conjunta em torno do trabalho e pelo importante apoio em saber que caso precisasse, ele estaria presente.

Agradeço a Prof. Dra. Gerly Anne, que embora estivéssemos distantes fisicamente, sua presença foi sempre constante e, importantíssima foi sua colaboração nos últimos passos da realização deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Airton, pelas revisões e impulso dos trabalhos publicados, e pela sua gentileza e amizade.

Agradeço ao Marcio pela sua importante participação na realização do projeto CAPES-COFECUB, pela sua presença via internet em dias difíceis de serem vencidos (mesmo sem saber) e pelas importantes dicas de como conduzir-me em Lille.

Agradeço ao Vicente por suas dicas e metodologias na realização da etapa de experimentos realizados em Lille, que me facilitaram a "vida" de maneira especial.

Agradeço a Nylane pelos primeiros passos na "migração", pela sua colaboração, atenção e amizade.

Agradeço aos técnicos e funcionários do laboratório em Lille: Miriam, Jacqueline, Marisa, Janine, Marlene, Anne Marie, e Michele.

Agradeço a Vandinha, pela sua ajuda no dia-a-dia do laboratório, pelo seu carinho e amizade.

Agradeço aos estudantes de iniciação científica que comigo trabalharam: Sabrina, Romualdo, Ingrid, Karol, e Kelly.

Agradeço a turma do laboratório, que me proporcionou dias de alegria e um bom convívio: Mirna, Carlos, Vílma, Mariana, Renata, Pedro, Milena, Marcio, Sílvia, Adriana, Cristina e Gurgel.

Agradeço Cristina e Pedro, pelos bons momentos passados juntos, que ajudaram a tornar leve a estadia em Lille.

Agradeço ao pessoal da Farmacologia, Sílvia, Áurea, Marta, Joana, Haroldo, Dra. Artemizia, e Antonio, pela imensa colaboração no transcorrer desse trabalho.

Agradeço aos professores do departamento de Fisiologia e Farmacologia que contribuíram para minha formação científica.

Agradeço ao CNPq, a CAPES e a COFECUB (França), pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

Agradeço a Rafael, Dominique, minha mãe e irmãos, que são fundamentais em minha vida, por serem e estarem.

Agradeço finalmente a Deus que esteve e esta em mim a cada segundo de minha existência, nos bons e maus momentos, quando acerto e quando erro!

Veruska Bezerra de Menezes Alencar

LISTA DE ABREVIATURAS

%: porcentagem

± E.P.M. mais ou menos o erro padrão da média

°C: graus centígrados

µg: micrograma

µL: microlitro

AMA: lectina de *Arum maculatum*

BVL: lectina de *Bauhinia variegata*

BSA: Soro Albumina Bovina

CINC-1: citocina indutora de quimiotaxia de neutrófilo -1

CINC-2 α : citocina indutora de quimiotaxia de neutrófilo -2 alfa

CINC-2 β : citocina indutora de quimiotaxia de neutrófilo -2 beta

g: grama

G-CSF: Fator estimulador de colônia de granulócitos

GM-CSF: Fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago

h: hora

HTA: lectina de *Helianthus tuberosus*

i.p.: intraperitoneal

IFN- α : Interferon - gama

IL-1: Interleucina 1

IL-10: Interleucina 10

IL-13: Interleucina 13

IL-15: Interleucina 15

IL-18: Interleucina 18

IL-3: Interleucina 3

IL-4: Interleucina 4

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

kDa: KiloDaltons

kg: Kilograma

LPS: Lipopolissacarídeo

M : molar

m/v: massa por volume

M-CSF: Fator estimulador de colônia de macrófago

mg: miligrama

Min: minutos

MIP-1: proteína inflamatória de macrófago - 1

MIP-2: proteína inflamatória de macrófago - 2

mL: Mililitro

MN: Migração de neutrófilos

NO: óxido nítrico

PAL: lectina de *Pisum arvense*

PGD₂: prostaglandina D₂

PGE₂: prostaglandina E₂

PGI₂: prostaciclina

Sal: salina

Tg: Tioglicolato

TNF- α : Fator de necrose tumoral - alfa

UI/mL: Unidades Internacionais por mililitro

x g: vezes a força da gravidade

α : alfa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema ilustrativo da disposição das lectinas nas células animais.

Figura 2: Esquema ilustrativo da estrutura de uma selectina

Figura 3: Esquema ilustrativo da cascata inflamatória

Figura 4: Etapas do processo de migração de neutrófilos

Figura 5: Manuseio do sobrenadante de macrófagos..

Figura 6: Isolamento de neutrófilos.

Figura 7: Isolamento de mastócitos

Figura 8. A lectina de *Pisum arvense* foi capaz de induzir migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos.

Figura 9. A lectina de *Bauhinia variegata* foi capaz de induzir migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos.

Figura 10. A lectina de *Arum maculatum* foi capaz de induzir migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos.

Figura 11. A lectina de *Helianthus tuberosus* foi capaz de induzir migração para a cavidade peritoneal de ratos.

Figura 12. A incubação da lectina de *Pisum arvense* com seu açúcar específico, foi capaz de reduzir a migração de neutrófilos induzida pela lectina sozinha.

Figura 13. A incubação da lectina de *Bauhinia variegata* com seu açúcar específico, foi capaz de reduzir a migração de neutrófilos induzida pela lectina sozinha.

Figura 14. A incubação da lectina *Arum maculatum* com seu açúcar específico, foi capaz de inibir a migração de neutrófilos induzida pela lectina sozinha.

Figura 15. A incubação da lectina de *Helianthus tuberosus* com seu açúcar específico, foi capaz de inibir a migração de neutrófilos induzida pela lectina sozinha.

Figura 16. A redução da população de células residentes, pela lavagem da cavidade peritoneal, não inibiu a migração de neutrófilos induzida por PAL.

Figura 17. A redução da população de células residentes, pela lavagem da cavidade peritoneal, reduziu a migração de neutrófilos induzida por BVL.

Figura 18. A redução da população de células residentes, pela lavagem da cavidade peritoneal, não inibiu a migração de neutrófilos induzida por AMA.

Figura 19. A redução da população de células residentes, pela lavagem da cavidade peritoneal, não inibiu a migração de neutrófilos induzida por HTA.

Figura 20. O pré-tratamento com tioglicolato potencia a migração de neutrófilos induzida por PAL.

Figura 21. O pré-tratamento com tioglicolato potencia a migração de neutrófilos induzida por BVL.

Figura 22. O pré-tratamento com tioglicolato potencia a migração de neutrófilos induzida por AMA.

Figura 23. O pré-tratamento com tioglicolato não potencia de maneira significativa a migração de neutrófilos induzida por HTA.

Figura 24. O sobrenadante de macrófagos em cultura estimulados com PAL apresenta atividade quimiotática para neutrófilos.

Figura 25. O sobrenadante de macrófagos em cultura estimulados com BVL apresenta atividade quimiotática para neutrófilos.

Figura 26. O sobrenadante de macrófagos em cultura estimulados com AMA apresenta atividade quimiotática para neutrófilos.

Figura 27. O sobrenadante de macrófagos em cultura estimulados com HTA não apresenta atividade quimiotática para neutrófilos.

Figura 28. A depleção de mastócitos pelo pré-tratamento com o composto 48/80 potencia a migração de neutrófilos induzida por PAL.

Figura 29. A depleção de mastócitos pelo pré-tratamento com o composto 48/80 potencia a migração de neutrófilos induzida por BVL.

Figura 30. A depleção de mastócitos pelo pré-tratamento com o composto 48/80 não potencia a migração de neutrófilos induzida por AMA.

Figura 31. A depleção de mastócitos pelo pré-tratamento com o composto 48/80 potencia a migração de neutrófilos induzida por HTA.

Figura 32. A lectina de *Pisum arvense* induz quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*.

Figura 33. A lectina de *Bauhinia variegata* induz quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*.

Figura 34. A lectina de *Arum maculatum* induz quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*.

Figura 35. A lectina de *Helianthus tuberosus* induz quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*.

Figura 36: Porcentagem do aumento da Intensidade de Fluorescência emitida por macrófagos de ratos incubados com as lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*.

Figura 37: Interação da lectina de *Pisum arvense* marcada com FITC à macrófagos de ratos.

Figura 38: Interação da lectina de *Bauhinia variegata* marcada com FITC à macrófagos de ratos

Figura 39: Interação da lectina de *Arum maculatum* marcada com FITC à macrófagos de ratos

Figura 40: Interação da lectina de *Helianthus tuberosus* marcada com FITC à macrófagos de ratos.

Figura 41: Porcentagem do aumento da Intensidade de Fluorescência emitida por mastócitos de ratos incubados com as lectinas *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*.

Figura 42: Interação da lectina de *Pisum arvense* marcada com FITC à mastócitos de ratos.

Figura 43: Interação da lectina de *Bauhinia variegata* marcada com FITC à mastócitos de ratos.

Figura 44: Interação da lectina de *Arum maculatum* marcada com FITC à mastócitos de ratos.

Figura 45: Interação da lectina de *Helianthus tuberosus* marcada com FITC à mastócitos de ratos.

Figura 46: Porcentagem do aumento da Intensidade de Fluorescência emitida por neutrófilos humanos incubados com as lectinas *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*.

Figura 47: Interação da lectina de *Pisum arvense* marcada com FITC à neutrófilos humanos.

Figura 48: Interação da lectina de *Bauhinia variegata* marcada com FITC à neutrófilos humanos.

Figura 49: Interação da lectina de *Arum maculatum* marcada com FITC à neutrófilos humanos.

Figura 50: Interação da lectina de *Helianthus tuberosus* marcada com FITC à neutrófilos humanos.

Figura 51: Porcentagem do aumento da Intensidade de Fluorescência emitida por monócitos humanos derivados da linhagem celular HL60, incubados com as lectinas *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*.

Figura 52: Interação da lectina de *Pisum arvense* marcada com FITC à monócitos derivados da linhagem celular humana HL60.

Figura 53: Interação da lectina de *Bauhinia variegata* marcada com FITC à monócitos derivados da linhagem celular humana HL60.

Figura 54: Interação da lectina de *Arum maculatum* marcada com FITC à monócitos derivados da linhagem celular humana HL60.

Figura 55: Interação da lectina de *Helianthus tuberosus* marcada com FITC à monócitos derivados da linhagem celular humana HL60.

Figura 56. Hipótese de mecanismo de efeito da lectina de *Pisum arvense* na migração de neutrófilos.

Figura 57. Hipótese de mecanismo de efeito da lectina de *Arum maculatum* na migração de neutrófilos.

Figura 58. Hipótese de mecanismo de efeito da lectina de *Helianthus tuberosus* na migração de neutrófilos.

Figura 59. Hipótese de mecanismo de efeito da lectina de *Bauhinia variegata* na migração de neutrófilos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais mediadores inflamatórios

Tabela 2. Análise da interação das lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia Variiegta*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*, marcadas com FITC, aos macrófagos de ratos.

Tabela 3. Análise da interação das lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia Variiegta*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*, marcadas com FITC, aos mastócitos de ratos.

Tabela 4. Análise da interação das lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia Variiegta*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*, marcadas com FITC, aos neutrófilos humanos.

Tabela 5. Análise da interação das lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia Variiegta*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*, marcadas com FITC, aos monócitos humanos.

Tabela 6. Comparação da interação das lectinas PAL(20µg), BVL(20µg), AMA(20µg) e HTA(20µg), marcadas com FITC, a macrófagos de ratos pré-incubados com o sobrenadante de culturas de macrófagos estimulados com as mesmas lectinas.

Tabela 7. Comparação da interação das lectinas pal(20µg), bvl(20µg), ama(20µg) e hta(20µg), marcadas com FITC, a mastócitos de ratos pré-incubados com o sobrenadante de culturas de macrófagos estimulados com as mesmas lectinas.

Tabela 8. Sumário da interação das lectinas às células do sistema imune e seus efeitos sobre os experimentos de migração.

RESUMO

EFEITO DE LECTINAS VEGETAIS DE *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*, NA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E INTERAÇÃO COM CÉLULAS INFLAMATÓRIAS. VERUSKA BEZERRA DE MENEZES ALENCAR. Tese apresentada ao Curso de pós-graduação em Farmacologia do Depto de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina - Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Farmacologia. Data da defesa: 26 de fevereiro de 2003. Sob orientação de: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.

Lectinas são um grupo de proteínas que ligam-se aos carboidratos, de origem não imune. Estudos demonstram que estas proteínas possuem importantes atividades biológicas no reconhecimento de células cancerosas, estimulação do sistema imune, servindo também como ferramenta de estudo, para identificação de carboidratos, como inseticidas, entre outras. Seguindo esta linha, os objetivos deste trabalho foram de investigar a atividade pró-inflamatória das lectinas de *Pisum arvense* (PAL), *Bauhinia variegata* (BVL), *Arum maculatum* (AMA) e *Helianthus tuberosus* (HTA), e suas interações com células do sistema imunes. No estudo da atividade pró-inflamatória das lectinas, foram realizados, *in vivo* (ratos), experimentos de migração de neutrófilos (MN), usando o modelo de peritonite e, *in vitro*, a MN foi avaliada em câmara de Boyden. Nos experimentos de MN, *in vivo*, o papel das células residentes, na indução da migração foram avaliados após serem realizadas lavagens das cavidades peritoneais dos ratos, bem como tratamentos com tioglicolato (Tg) a 3%, composto 48/80, e injeção do sobrenadante de cultura macrófagos estimulados com as lectinas. Em todos os experimentos, a MN foi avaliada 4 h após a injeção dos estímulos, e estes estímulos foram injetados sempre após os tratamentos ou procedimentos de lavagens. A avaliação dos efeitos lectínicos foram realizados bloqueando os sítios de ligação aos carboidratos com seus açúcares específicos antes da injeta-los como estímulos. Para o estudo da interação das lectinas com as células, as lectinas foram marcadas com FITC, incubadas por 30min a 4°C aos macrófagos (Mø) e mastócitos (MC) de ratos, e aos neutrófilos humanos e monócitos humanos. Após incubação, diferenças da intensidade fluorescência (IF) das células, foram examinada por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que as quatro lectinas induziram MN de maneira significativa. A depleção de células residentes (lavagem), não inibiu a MN induzida por PAL, AMA, HTA, mas inibiu o efeito de BVL. O tratamento com Tg potencializou a MN induzida por PAL, AMA e BVL, mas não alterou a MN induzida por HTA. A depleção de MC por 48/80 potencializou a MN induzida por PAL, HTA e BVL, mas não alterou a MN induzida por AMA. A injeção do sobrenadante de macrófagos em cultura, estimulados com PAL, AMA e BVL, mas não com HTA, induziram MN. *In vitro*, PAL, BVL, AMA e HTA induziram MN significativamente. A incubação das lectinas marcadas com FITC aos Mø, MC, neutrófilos e monócitos, aumentaram a IF em uma magnitude de 238, 363, 792 e 453% respectivamente, para PAL; 479, 136, 213 e 281% respectivamente para BVL; 625, 279, 213 e 486% respectivamente para AMA e 89, 187, 243, 94% respectivamente para HTA. Em conclusão: PAL, BVL, AMA e HTA são pró-inflamatórias e ligam-se significativamente aos Mø, MC, neutrófilos e monócitos, entretanto, os mecanismos da indução da MN e as interações às células são diferentes, dependendo da lectina estudada.

ABSTRACT

EFFECT OF LECTINAS FROM *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* AND *Helianthus tuberosus*, ON NEUTROPHIL MIGRATION AND INTERACTION WITH INFLAMMATORY CELLS. VERUSKA BEZERRA DE MENEZES ALENCAR. Thesis presented to Pharmacology Pos-graduation Course from Department of Physiology and Pharmacology of the Faculty of Medicine - Federal University of the Ceará, as prerequisite for acquire the heading of Doctor in Pharmacology. Date to defense: 26 of February of 2003. Under orientation of: Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro.

Lectins are a group of carbohydrate-binding proteins of nonimmune origin. Studies demonstrate that these proteins possess important biological activities in the recognition of cancerous cells, stimulation of the immune system, also serving as study tools, for identification of carbohydrates, or insecticide, among others. Following this line the objectives of this work was to investigate the pro-inflammatory activity of the lectins from *Pisum arvense* (PAL), *Bauhinia variegata* (BVL), *Arum maculatum* (AMA) and *Helianthus tuberosus* (HTA), and their interactions with immune system cells. In the study of pro-inflammatory activity of lectins, experiments, *in vivo* (rats), of neutrophil migration (MN) has been performed, using the peritonitis model and, *in vitro*, MN was evaluated in Boyden's chamber. In the experiments of MN, *in vivo*, the role of resident cells, in induction of migration had been evaluated by lavage of the peritoneal cavities of the rats, as well as treatments with tioglicolato (Tg) 3%, 48/80 compound and injection of supernatant from macrophages culture stimulated by lectins. In all experiments, the MN was evaluated 4h after the injection of stimuli, and these stimuli had been injected always after the treatments or procedures of lavage. The evaluation of lectin effects was even performed blocking the carbohydrate-binding site with their specific sugars previously to the stimulus. For lectin-cell interaction analysis, lectins were marked with FITC, incubated for 30 min at 4°C to the macrophages (M ϕ) and mast cells (MC) from rats, and to human neutrophil and monocytes. After incubation, differences of fluorescence intensity (IF) of cells were examined by flow cytometry. The results had shown that the four lectins had significant effect on MN. The depletion of resident cells (lavage), did not inhibit the induced MN by PAL, AMA, HTA, but inhibited the BVL effect. The treatment with Tg enhanced the MN induced by PAL, AMA and BVL, but it did not modify the MN induced by HTA. The depletion of MC by 48/80 enhanced the MN induced by PAL, HTA and BVL, but it did not modify the AMA-effect. The injection of the supernatant of macrophages culture, stimulated by PAL, AMA and BVL, but not by HTA, induced MN. *In vitro*, PAL, BVL, AMA and HTA have induced significantly MN. Incubation FITC-lectins to M ϕ , MC, neutrophils and monocytes, increased the IF in a magnitude as higher as 238, 363, 792 and 453% respectively, for PAL; 479, 136, 213 and 281% respectively for BVL; 625, 279, 213 and 486% respectively for AMA and 89, 187, 243, 94% respectively for HTA. In conclusion: The PAL, BVL, AMA and HTA are pro-inflammatory and bind significantly to M ϕ , MC, neutrophils and monocytes. However, the mechanisms of induction of MN and interactions to cells are differently, depending on the studied lectin.

RÉSUMÉ

EFFET DE LECTINES VEGETALS DE *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* ET *Helianthus tuberosus*, SUR LA MIGRATION DE NEUTROPHILE ET INTERACTION AVEC LES CELLULES INFLAMMATOIRES. VERUSKA BEZERRA DE MENEZES ALENCAR. Thèse présentée au cours de Pos-graduation de Pharmacologie du Département de Physiologie et Pharmacologie de la Faculté de Médecine de l'Université Fédérale du Ceará, nécessaire à acquérir le Titre de Docteur en Pharmacologie. Date de la soutenance de la Thèse: 26 février 2003. Sous l'orientation de: Prof. Dr. Ronaldo De Albuquerque Ribeiro.

Les lectines sont un groupe de protéines qui s'attachent aux carbohydrates, qui ne sont pas d'origine immunitaire. Les études démontrent que ces protéines possèdent des activités biologiques importantes dans l'identification des cellules cancéreuses, stimulation du système immunitaire, servant également aux études d'identification des carbohydrates, comme l'insecticide, et pour d'autres activités. Ainsi, les objectifs de ce travail avaient été d'étudier les activités pro-inflammatoires des lectines de *Pisum arvense* (PAL), *Bauhinia variegata* (BVL), *Arum maculatum* (AMA) et *Helianthus tuberosus* (HTA), et ses interactions avec les cellules du système immunitaire. Dans l'étude de l'activité pro-inflammatoire des lectines, les expériences, *in vivo* (de rats), de migration de neutrophiles (MN) ont été réalisées, en utilisant le modèle de péritonite, et *in vitro*, la MN a été évalué dans une chambre de Boyden. Dans les expériences de MN, *in vivo*, le rôle des cellules résidentes, sur l'induction de la migration avait été évalué par le lavage des cavités péritonéales des rats, et par les traitements avec tioglicolate (Tg) 3%, le composé 48/80, et l'injection de surnageant de la culture de macrophages stimulée par les lectines. Dans toutes les expériences, la MN était évalué 4h après l'injection des stimulus, et ces stimulus avait été injecté toujours après les traitements ou les procédures de lavage. L'évaluation des effets lectiniques ont été réalisé par blocage des sites de liaison aux carbohydrates avec ses sucres spécifiques, avant d'être injecter comme stimulus. Pour l'étude d'interaction des lectines avec les cellules, les lectines avaient été marquées par FITC, incubées pendant 30 minutes à 4°C aux macrophages (M ϕ) et mastocytes (MC) des rats, et aux neutrophile et monocytes humaine. Après incubation, les différences de l'intensité de fluorescence (IF) des cellules, ont été examinée par cytométrie de flux. Les résultats avaient démontrés que les quatre lectines avaient significativement induites la MN. La déplétion des cellules résidentes (lavage), n'a pas empêché la MN induit par PAL, AMA, HTA, mais a empêché l'effet de BVL. Le traitement avec Tg a augmenté la MN induit par PAL, AMA et BVL, mais il n'a pas modifié la MN induit par HTA. La déplétion de MC pour 48/80 a augmenté la MN induit par PAL, HTA et BVL, mais il n'a pas modifié la MN induit par AMA. L'injection du surnageant des cultures de macrophages, stimulé par PAL, AMA et BVL, mais pas par HTA, a induite la MN. *In vitro*, PAL, BVL, AMA et HTA avaient induit significativement la MN. L'incubation de lectines marquées par FITC aux M ϕ , MC, neutrophiles et monocytes, avait augmentés la IF dans une grandeur de 238, 363, 792 et 453% respectivement, pour PAL; 479, 136, 213 et 281% respectivement pour BVL; 625, 279, 213 et 486% respectivement pour AMA et 89, 187, 243, 94% respectivement pour HTA. En conclusion: PAL, BVL, AMA et HTA sont pro-inflammatoires et s'attachent de manière significative aux M ϕ , MC, neutrophiles et monocytes, pourtant, les mécanismes de l'induction de la MN et les interactions aux cellules sont différents, selon le lectine étudié.

SUMÁRIO

I – INTRODUÇÃO	02
1. Lectinas.....	02
1.1. Lectinas Animais.....	03
1.1.1. Lectinas Tipo-C.....	04
1.1.2. Galectinas.....	06
1.2. Lectinas Vegetais.....	09
1.2.1. Atividades e utilizações biológicas das lectinas.....	10
1.2.2. Lectinas de <i>Pisum arvense</i> , <i>Bauhinia variegata</i> , <i>Arum maculatum</i> , <i>Helianthus tuberosus</i>	13
2. Lectinas e reação inflamatória.....	14
2.1. Reação inflamatória.....	15
2.2. Processos da inflamação aguda (resposta inata).....	16
2.2.1. Eventos vasculares e celulares.....	16
2.2.2. Quimiotaxia.....	18
2.2.3. Fisiologia das células envolvidas na inflamação.....	19
a) Monócitos/Macrófagos.....	20
b) Mastócitos.....	23
c) Neutrófilos.....	24
d) Células endoteliais.....	26
2.2.4. Principais ações dos mediadores liberados pelas células envolvidas na inflamação.....	27
3. Justificativas e objetivos.....	30
II - MATERIAIS E MÉTODOS	33
1. Animais.....	34
2. Lectinas.....	34
3. Drogas e dissoluções.....	35
4. Protocolo experimental.....	36
4.1 – Investigação do efeito pró-inflamatório das lectinas de <i>Pisum arvense</i> , <i>Bauhinia variegata</i> , <i>Arum maculatum</i> e <i>Helianthus tuberosus</i> na migração de neutrófilos e a participação das células	

residentes neste processo.....	37
4.1.1 – Modelo da Peritonite.....	38
a) Efeito da injeção das lectinas PAL, BVL, AMA e HTA na cavidade peritoneal de ratos.....	38
b) Investigação do envolvimento dos açúcares, na indução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos induzida pelas lectina PAL, BVL, AMA e HTA.....	39
4.1.2 – Alterações na população de células residentes.....	40
a) Redução da população de células peritoneais residentes pela lavagem da cavidade peritoneal.....	40
b) Aumento da população de macrófagos residentes pelo tratamento com tioglicolato.....	41
c) Depleção da população de mastócitos pelo tratamento com o composto 48/80.....	54
4.1.3 – Avaliação do efeito da injeção do sobrenadante de culturas de macrófagos de ratos, pré-estimuladas com as lectinas de <i>Pisum arvense</i>, <i>Bauhinia variegata</i>, <i>Arum maculatum</i> e <i>Helianthus tuberosus</i>, sobre a migração de neutrófilos	43
4.1.3.1 – Isolamento dos macrófagos.....	43
4.1.3.2. – Cultura de macrófagos e preparação do sobrenadante para injeção na cavidade peritoneal dos ratos.....	44
4.2 – Indução de migração de neutrófilos <i>in vitro</i> pelas lectinas de <i>Pisum arvense</i>, <i>Bauhinia variegata</i>, <i>Arum maculatum</i> e <i>Helianthus tuberosus</i>.....	45
a) Isolamento dos neutrófilos	45
b) Ensaio de quimiotaxia de neutrófilos	47
4.3 – Experimentos de citometria de fluxo.....	49
4.3.1 – Análise da interação das lectinas de <i>Pisum arvense</i>, <i>Bauhinia variegata</i>, <i>Arum maculatum</i> e <i>Helianthus tuberosus</i> a macrófagos/monócitos, mastócitos, e neutrófilos, por citometria de fluxo.....	50
a) Obtenção das células.....	50
a.1) Isolamento e cultura dos macrófagos de ratos.....	50

a.2) Isolamento dos mastócitos de ratos.....	51
a.3) Isolamento dos neutrófilos humanos.....	52
a.4) Cultura de monócitos humanos (derivados da linhagem HL60).....	52
b) Marcação das lectinas.....	54
c) Ensaio de citometria de fluxo.....	55
4.3.2. Avaliação do aumento da intensidade de fluorescência de macrófagos e mastócitos pré-incubados com o sobrenadante de cultura de macrófagos pré-estimulados com as lectinas.....	56
5. Análise estatística.....	57
III – RESULTADOS	
1. Efeito das lectinas de <i>Pisum arvense</i> , <i>Bauhinia variegata</i> , <i>Arum maculatum</i> e <i>Helianthus tuberosus</i> na indução da migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de ratos.....	60
2. Efeito das lectinas de <i>Pisum arvense</i> , <i>Bauhinia variegata</i> , <i>Arum maculatum</i> e <i>Helianthus tuberosus</i> , incubadas com seus açúcares específicos, na indução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos.....	60
3. Papel das células residentes na indução da migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de ratos, pelas lectinas de <i>Pisum arvense</i> , <i>Bauhinia variegata</i> , <i>Arum maculatum</i> e <i>Helianthus tuberosus</i>	70
3.1. Efeito das lectinas PAL, BVL, AMA e HTA após a depleção da população das células residentes pela lavagem da cavidade peritoneal de ratos.....	70
3.2. Efeito do aumento de da população de macrófagos da cavidade peritoneal dos ratos, pelo pré-tratamento com Tioglicolato 3%, na indução da migração de neutrófilos estimulada pelas lectinas de <i>Pisum arvense</i>, <i>Bauhinia variegata</i>, <i>Arum maculatum</i> e <i>Helianthus tuberosus</i>.....	70
3.3. Efeito da injeção do sobrenadante de culturas de macrófagos de ratos, estimuladas com as lectinas de <i>Pisum arvense</i>, <i>Bauhinia variegata</i>, <i>Arum maculatum</i> e <i>Helianthus tuberosus</i>, na indução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos.....	71

3.4 Efeito da depleção de mastócitos da cavidade peritoneal de ratos pelo composto 48/80, na migração de neutrófilos induzida pelas lectinas de <i>Pisum arvense</i> , <i>Bauhinia Variegata</i> , <i>Arum maculatum</i> e <i>Helianthus tuberosus</i>	81
4. Estudo de migração de neutrófilos <i>in vitro</i> induzida pelas lectinas de <i>Pisum arvense</i> , <i>Bauhinia variegata</i> , <i>Arum maculatum</i> e <i>Helianthus tuberosus</i>	81
5. Análise por citometria de fluxo da interação das lectinas de <i>Pisum arvense</i> , <i>Bauhinia variegata</i> , <i>Arum maculatum</i> e <i>Helianthus tuberosus</i> a macrófagos de ratos.....	95
6. Análise por citometria de fluxo da interação das lectinas de <i>Pisum arvense</i> , <i>Bauhinia variegata</i> , <i>Arum maculatum</i> e <i>Helianthus tuberosus</i> a mastócitos de ratos.....	103
7. Análise por citometria de fluxo da interação das lectinas de <i>Pisum arvense</i> , <i>Bauhinia variegata</i> , <i>Arum maculatum</i> e <i>Helianthus tuberosus</i> a neutrófilos humanos.....	111
8. Análise por citometria de fluxo da interação das lectinas de <i>Pisum arvense</i> , <i>Bauhinia variegata</i> , <i>Arum maculatum</i> e <i>Helianthus tuberosus</i> a monócitos humanos derivados da linhagem celular HL60.....	119
9. Análise por citometria de fluxo da interação das lectinas de <i>Pisum arvense</i> , <i>Bauhinia variegata</i> , <i>Arum maculatum</i> e <i>Helianthus tuberosus</i> à mastócitos ou macrófagos de ratos pré-incubados com o sobrenadante de culturas de macrófagos estimuladas com cada lectina respectivamente.....	127
IV – DISCUSSÃO	131
V – CONCLUSÕES	147
VI – REFERÊNCIAS	151

I. INTRODUÇÃO

I – INTRODUÇÃO

O estudo das lectinas, tem permitido a aplicação prática de muitas dessas moléculas na glicociência, na qualidade de ferramentas biológicas, servindo para caracterizar glicoproteínas e glicopeptídeos, identificar fases de diferenciação celular, identificar proteínas membranares humanas ou de bactérias e fungos, etc... (Rüdiger, 1998; Drickamer & Taylor, 1998). Estas proteínas tem sido amplamente estudadas na imunologia e câncer, pela sua capacidade de ligarem-se a glicoproteínas encontradas nas superfícies celulares.

Entretanto, a interação dessas moléculas as células, podem desencadear complexas respostas celulares, sendo necessário assim, estabelecer suas interações às células animais e humanas, sua capacidade de estimulação celular, seu potencial antigênico, sua toxicidade e seletividade celular.

1. LECTINAS

A palavra lectina é originaria do latim e significa *para escolher* (Rüdiger, 1998). É utilizado para designar proteínas que possuem a capacidade de ligarem-se a carboidratos, sendo definidas em 1995 por Peumans e colaboradores como: *proteínas de origem não imune que possuem pelo menos um domínio de ligação reversível à carboidratos*. Estas moléculas interagem com glicoconjugados de superfície celular, podendo ou não determinar a formação de ligações cruzadas entre células adjacentes, levando-as a aglutinação (Lis & Sharon, 1986). As lectinas são amplamente produzidas na natureza, sendo normalmente encontradas em vegetais, animais, bactérias, fungos, protozoários e vírus (Pusztai., 1991).

As lectinas mais investigadas têm sido as lectinas de plantas, em particular as pertencentes a família das leguminosas, que formam um grupo de proteínas estruturalmente similar, mas com distintas especificidades aos carboidratos (Cavada *et al.*, 2001), sendo a especificidade das lectinas determinada pelas exatas seqüências dos sítios de ligação, e pequenas mudanças em sua estrutura como a substituição de um ou dois aminoácidos, pode resultar em alterações de especificidade (Sharon & Lis, 1995).

1.1. LECTINAS ANIMAIS

Estruturas complexas de oligossacarídeos estão dispostas nas superfícies celulares, incorporadas na matriz extracelular, ou agregadas a glicoproteínas secretadas, e desempenham papel estrutural, mediado pela transferência de glicoconjugados para a superfície celular, ou atuam como importantes estruturas que medeiam os eventos de interação célula-célula ou célula-matriz extra celular. O papel não estrutural dos oligossacarídeos requer geralmente a participação de lectinas (Drickamer & Taylor, 1998).

As lectinas animais são proteínas com vários domínios, mas a atividade de ligar-se à carboidrato é conferida a um simples domínio considerado como o domínio lectínico. Um grupo dessas lectinas é mais encontrado intracelularmente em compartimentos do lúmen, com atividades de transferências, secretoras, e ainda como alvo para glicoproteínas. No outro grupo, as lectinas teriam atividade extracelulares e podem ser localizadas na membrana plasmática (Drickamer & Taylor, 1998).

De acordo ainda com Drickamer e Taylor (1998), as lectinas encontradas nas células animais podem ser divididas em: Calnexin e Lectinas tipo-L (encontradas no retículo endoplasmático, relacionadas com a saída das proteínas); Lectinas tipo-M (encontradas no retículo endoplasmático, associada a degradação de glicoproteínas); Lectinas tipo-P (complexo de golgi), Lectinas tipo-I (relacionadas com adesão celular, também denominadas *Siglecs*); Lectinas tipo-R (alvo para enzimas e participantes do *turnover* de glicoproteínas hormonais); Lectinas tipo-C (Selectinas e Colectinas) e as Galectinas (**Figura 1**).

1.1.1. LECTINAS TIPO-C

As lectinas tipo-C são proteínas animais que permeiam a interação célula-célula, pela ligação do domínio lectínico (domínio N-terminal) dessas proteínas, à proteínas que contém um carboidrato, com domínio de ligação tipo-C, sendo por isso classificadas como lectinas tipo-C (Cummings, 1999).

As selectinas são as mais conhecidas lectinas tipo-C, no entanto hoje sabemos que o papel das lectinas tipo-C não está somente limitado as selectinas e alguns receptores foram demonstrados como lectinas tipo-C, como é o caso receptor IgE Fc (Fc γ RII) (Fukuda *et al.*, 1999).

As selectinas foram inicialmente apresentadas como moléculas de adesão de leucócitos-1, 2 e 3, sendo hoje chamadas de Selectinas-L (leucócito), E- (endotelial), e P- (plaqueta). São expressas nas membranas celulares de linfócitos, células endoteliais e plaquetas respectivamente (Bevilacqua *et al.*, 1991).

Cada selectina possui um domínio amino-terminal (domínio lectínico), que reconhece carboidratos, seguido por um módulo semelhante a um fator epidermal de crescimento, uma série de SCRs (do inglês: S=short, C=consensus, R=repeats), um

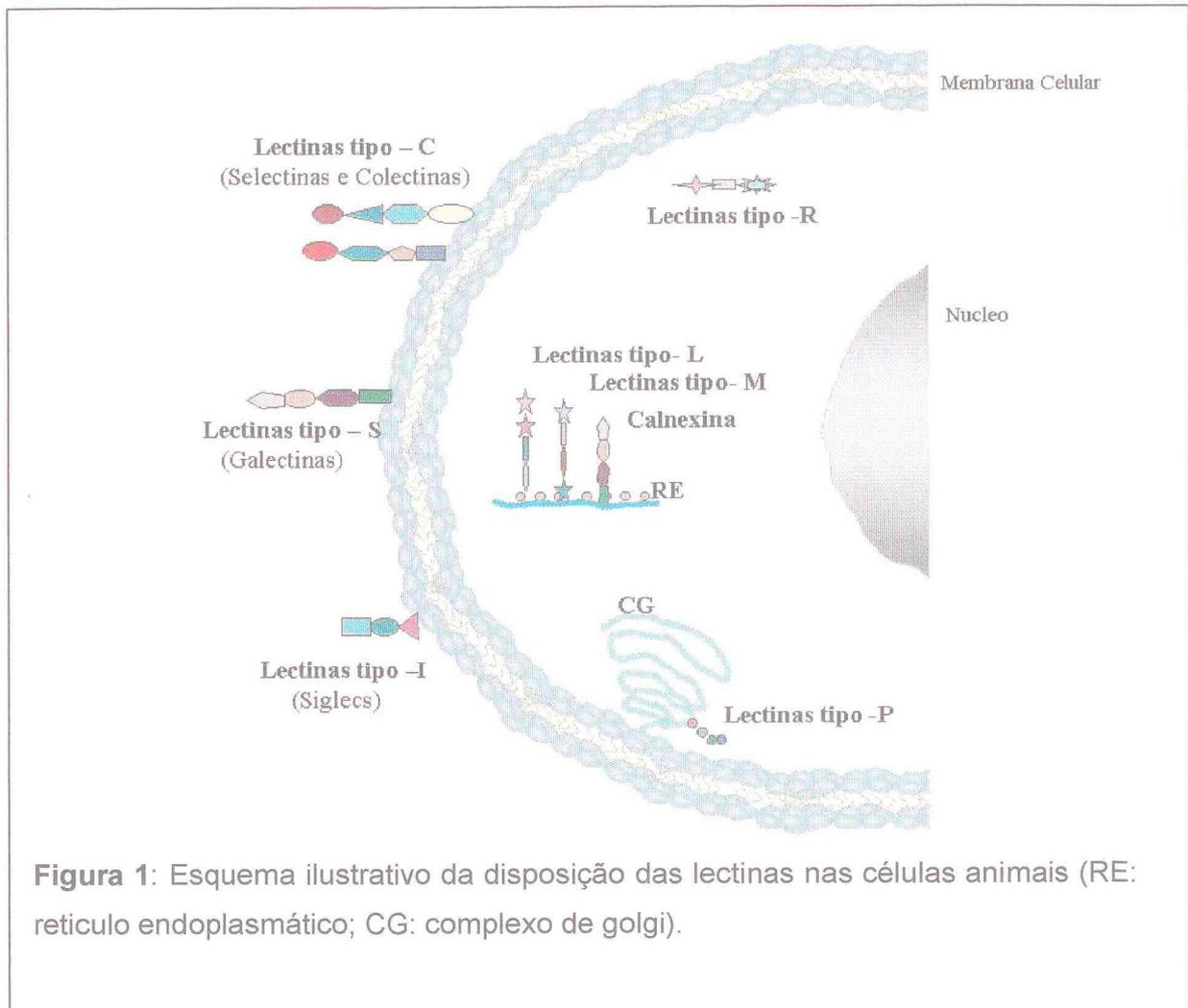


Figura 1: Esquema ilustrativo da disposição das lectinas nas células animais (RE: retículo endoplasmático; CG: complexo de golgi).

domínio transmembrana, e uma pequena cauda citoplasmática (domínio citoplasmático) (McEver, 1997), como podemos ver na **figura 2**.

Os leucócitos usam as selectinas para prender-se e rolar sobre as células endoteliais, sobre plaquetas ativas e ainda para formar agregados de leucócitos (Bargatze *et al.*, 1994; Simon *et al.*, 1993). A interação leucócito-leucócito, e leucócito-plaqueta pode servir para amplificar o recrutamento de leucócitos para a superfície endotelial de acordo com Fuhlbrigge e colaboradores (1996).

A expressão de L-selectinas é normalmente regulada para permitir o movimento de linfócitos para linfonodos periféricos e a migração celular ao sítios afetados, no entanto as E- e P-selectinas são expressas sobre células endoteliais e plaquetas somente após a ativação destas células por citocinas ou LPS por exemplo (McEver, 1997). Assim, a expressão constitutiva de selectinas em leucócitos, é fundamental para a regulação da resposta inflamatória, mediando o rolamento e agregação celular, bem como o fluxo dos leucócitos. Entretanto, sob condições patológicas podem contribuir para a formação de trombos e metástases (McEver, 1997).

1.1.2. GALECTINAS

As galectinas são uma família de proteínas presentes desde invertebrados aos mamíferos, que possuem como características comuns o seqüenciamento de aminoácidos e a afinidade por açúcares γ -galactosaminicos (Barondes *et al.*, 1994).

Na grande maioria, as galectinas são encontradas intracelularmente, mas algumas das galectinas são internalizadas por mecanismos ainda não bem definidos, sendo assim encontradas na superfície celular (Cooper & Barondes,

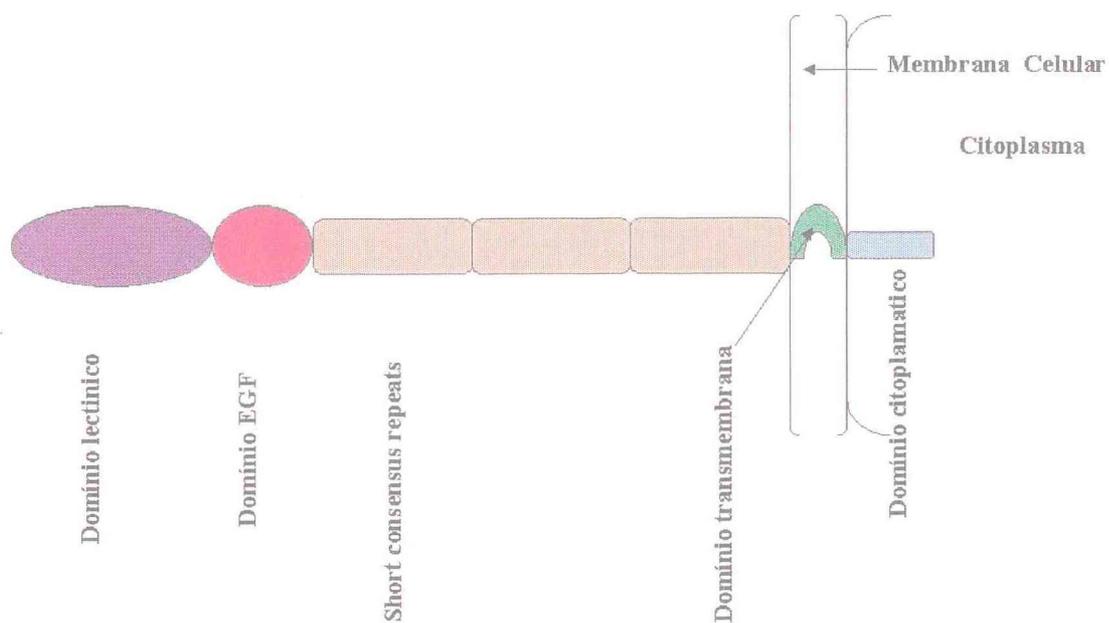


FIGURA 2: ESQUEMA ILUSTRATIVO DA ESTRUTURA DE UMA SELECTINA.

Uma selectina apresenta um domínio lectínico, um domínio tipo fator de crescimento epidérmico (EGF, do inglês: E=epidermal, G=growth, F=factor), uma seqüência de SCRs (do inglês: S=short, C=consensus, R=repeats), um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático.

1990). Essas proteínas são normalmente expressas nas células, sob condições normais, em concentração de cerca de 0.01mM. No entanto, sob condições especiais como durante a embriogênese, infecções virais e em presença de agentes inflamatórios, esses níveis chegam a 0.1mM (Rabinovich *et al.*, 1999).

Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado a participação de galectinas em vários processos fisiopatológicos *in vitro*: na adesão celular; regulação do crescimento celular; imunomodulação; apoptose; inflamação; embriogênese; reprodução; e na proliferação tumoral.

Estas proteínas podem ter ações divergentes, dependendo do ciclo celular, da quantidade expressa, bem como do tipo de receptor expresso. Por exemplo, na adesão celular, as galectinas participam da adesão célula-célula, ou célula-glicoconjugados da matriz extracelular, no entanto podem ter efeito inverso, provocando um bloqueio esteárico dos receptores $\alpha_7\beta_1$ de laminina, produzindo assim uma dissociação celular (Cooper *et al.*, 1991). De maneira similar, no processo embriogênico, as galectinas, como é o caso da galectina-1, possuem ora a capacidade de produzir mitogênese celular, ora bloqueiam o ciclo celular.

Nos sistema imune, as galectinas são expressas em células de linfonodos, baço e timo. Em estudos realizados com a galectina-1, foi observado que elas estão envolvidas na regulação de células T; inibem a proliferação celular de células T CD8+ induzidas por antígenos (efeito regulador); participam na quimiotaxia de eosinófilos e neutrófilos em presença de inflamação (Baum *et al.*, 1995; Rabinovich *et al.*, 1996; Matsumoto *et al.*, 1998; Blaser *et al.*, 1998); são imunossupressoras em doenças experimentais auto-imune, como a encefalomielite em ratos e miastenia graves em coelhos (Offner *et al.*, 1990; Levi *et al.*, 1983); além de promover apoptose em células corticais do timo, e em células T maduras, prevenindo a

expansão de clones auto-agressivos (Perillo *et al.*, 1995). No entanto, a galectina-3 previne a apoptose celular de células leucêmicas (*in vitro*) (Yang *et al.*, 1996), mostrando que estas galectinas, embora pertencentes a uma mesma família possuem diferentes atividades. Além disso, dados mostram que macrófagos peritoneais de ratos estimulados com diferentes estímulos, são hábeis a expressar cinco vezes mais galectinas, quando comparado com células normais (Rabinovich *et al.*, 1996).

1.2. LECTINAS VEGETAIS

As lectinas vegetais mais estudadas tem sido as de plantas superiores e de algas marinhas. Nas plantas superiores mais de 100 lectinas de diversas subordem e espécies foram isoladas, e as mais investigadas são originárias das leguminosas (Abdullaev & Mejia, 1997). As lectinas de leguminosas apresentam uma particularidade, que é a capacidade de ligarem-se a diferentes carboidratos, apresentando no entanto, grande similaridade ou homogeneidade estrutural. Uma das primeiras lectinas de leguminosas a ser melhor caracterizada, e que é nos dias de hoje referência para o estudo de outras lectinas, além de servir como importante ferramenta biológica, é a Concanavalina A (Con A), uma lectina glicose-manose específica (Rüdiger, 1998).

Tem-se observado que a grande maioria das lectinas de plantas são encontradas nas sementes, embora também estejam presente em raízes, caule e folhas. São sintetizadas e estocadas nas células, sendo posteriormente, excretadas através de vesículas membranares (van Driesseche, 1988; Moreira *et al.*, 1991; Rüdiger, 1998).

As lectinas apresentam propriedades fisicoquímicas bastante heterogêneas diferindo entre si em vários aspectos, tais como peso molecular, número de subunidades, presença ou ausência de cátions divalentes na molécula, especificidade, teor de açúcar, ponto isoelétrico entre outros (Loris *et al.*, 1997).

Em contraste com sua grande abundância nos vegetais, ainda é enigmático o real papel dessas lectinas nos vegetais, mas, evidências suportam a hipótese de que estas proteínas participam na defesa contra animais herbívoros e bactérias (Peumans & van Damme, 1995; Cavada *et al.*, 2001). Entretanto, vários estudos tem esclarecido os efeitos e utilidades biológicas destas proteínas.

1.2.1. ATIVIDADES E UTILIZAÇÕES BIOLÓGICAS DAS LECTINAS.

O estudo destas proteínas tem demonstrado que as mesmas possuem diversas atividades sobre células de mamíferos, e tem sido estudas em diversos modelos. Inicialmente, Stilmark (1888) observou que tais moléculas possuíam capacidade de aglutinar células, mas durante muito tempo, o estudo ficou somente neste estado, sendo somente no ultimo século retomado por outros pesquisadores.

Desde então as lectinas após serem caracterizadas, são utilizadas como ferramentas biológicas para caracterizarem glicoproteínas e glicopeptídeos, no estudo de diferenciação celular de células normais e cancerígenas, permitindo assim identificar as fases de transformação das células malignizadas, e na compreensão dos mecanismos e vias de ação de células do sistema imune (Rüdiger & Gabius, 2001).

Na clinica médica, as lectinas são utilizadas no diagnóstico e nível de malignidade tumoral, na tipagem de grupos sangüíneos, no fracionamento de

linfócitos e células da medula óssea para transplante de medula, na estimulação de linfócitos de pacientes imunossuprimidos, na citologia genética e imunohistoquímica de células e tecidos (Gengozian *et al.*, 1997; Ben-Yosef *et al.*, 1997; Rüdiger & Gabius, 2001).

Estes usos como ferramentas, ou adjuvantes em tratamentos clínicos, tem sido possíveis graças aos estudos já realizados, mas é grande ainda a necessidade de melhor lhes esclarecer. Nesse sentido podemos ressaltar que no campo da imunologia, novas lectinas tem sido investigadas quanto a capacidade de estimular a proliferação de linfócitos B de murinos (Gebauer *et al.*, 1982; Frier & Rudiger, 1990) e linfócitos humanos (Barral-Netto *et al.*, 1992); de estimular macrófagos à induzir a liberação de peróxido de hidrogênio (Rodriguez *et al.*, 1992) e NO (óxido nítrico) *in vivo* e *in vitro* (Andrade *et al.*, 1999); de estimular mastócitos a liberarem histamina (Gomes *et al.*, 1994; Ferreira *et al.*, 1996); de induzir migração de leucócitos e provocar edema de pata (Bento *et al.*, 1993), e na capacidade de induzir apoptose (Kulkarni & McCulloh, 1995; Barbosa *et al.*, 2001).

Nas pesquisas com câncer, além da identificação e caracterização tumoral já descrita em 1965 por Aub e colaboradores, as lectinas vegetais continuam a serem utilizadas como marcadores das células "anormais", devido as alterações membranares que ocorrem em tais células, dependentes de aberrações na glicosilação, e na expressão de novos receptores (Abdullaev & Mejia, 1997). Hoje é sabido, que estas células após transformação expressam uma maior quantidade de carboidratos como Sialyl Lewis X (Fukushima *et al.*, 1984; Fukada *et al.*, 1985; Saitoh *et al.*, 1992; Shimodaira *et al.*, 1997), Sialyl Lewis A, e NeuNAc α 2 \rightarrow 3Gal α 1 \rightarrow 3(Fuc α 1 \rightarrow 4)GlcNAc \rightarrow R (Maganani *et al.*, 1982; Itzkowitz *et al.*, 1988), sendo portanto identificados por certas lectinas com especificidades para

tais carboidratos. É graças as variações estruturais que existem entre as lectinas, as quais permitem ligações diferenciadas aos diferentes tipos de células tumorais, que estas moléculas tem sido úteis no diagnostico do grau de malignidade tumoral (Toda *et al.*, 1998).

Em outro sentido, vários autores têm demonstrado que as lectinas possuem ainda atividades anti-tumoral, (Shoham *et al.*, 1970; Maddox *et al.*, 1982; Ganguly & Das, 1991), bloqueiam a indução de metástases (Friberg *et al.*, 1972), e aumentam a sobrevivência dos animais estudados (Ganguly and Das, 1994).

Nos estudos com lectinas realizados pelo nosso grupo, temos demonstrado que as lectinas de plantas podem apresentar atividade anti ou pró-inflamatória. Dessa maneira, Assreuy e colaboradores (1997) demonstraram que lectinas ligadoras de glicose-manose, quando injetadas endovenosamente inibem a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos, em modelo de peritonite, bem como a atividade edematogênica induzida por carragenina, em modelo de edema de pata. Alencar e colaboradores (1999), em outro estudo utilizando três lectinas ligadoras de glicose manose e N-acetilglicosamina, demonstraram que a atividade anti-inflamatória dessas lectinas, em modelo de peritonite, pode ser devido a um bloqueio dos sítios ligadores das selectinas presentes nos neutrófilos. Ainda em modelo de peritonite, vimos (Alencar *et al.*, 2002) que a lectina de *Caesalpinia echinata* é capaz de induzir migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos, de maneira dose-dependente, e que a indução da migração dá-se, possivelmente, por mecanismo dependente e independente de células residentes. De maneira similar, o uso de outra lectina, porém de origem animal (espermedesina suína), mostrou também que esta lectina é capaz de induzir migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos, além

de estimular macrófagos e mastócitos a liberarem citocinas (Assreuy *et al.*, 2002a; Assreuy *et al.*, 2002b)

Em outro modelo inflamatório, modelo da cistite hemorrágica, nosso grupo demonstrou também, que as lectinas de plantas, são capazes de inibir os eventos inflamatórios celulares e vasculares e da lesão endotelial induzida por ciclofosfamida em camundongos (Assreuy *et al.*, 1999). De maneira geral, vimos que em todos esses efeitos pró ou anti-inflamatórios, ocorre o envolvimento de resíduos de carboidratos, provavelmente através da interação com o domínio lectínico, visto que quando as lectinas eram injetadas associadas aos seus carboidratos ligantes específicos, estas ações eram anuladas ou reduzidas.

Ainda no campo das pesquisas médicas, alguns estudos tem sido realizados com lectinas e o funcionamento circulatório e renal (Havt *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2001; Nothover & Nothover, 1994), no bloqueio da proliferação do vírus do HIV (Balzarini *et al.*, 1992; Charan *et al.*, 2000; Wang & Ng, 2001; Ye *et al.*, 2001). Vários laboratórios conceituados utilizam também as lectinas comercialmente produzidas, como por exemplo a Concanavalina A (Con A), como componentes de meios de cultura, com o intuito de estimular proliferação de culturas celulares.

Todos os dados mostrados fazem estas proteínas ocuparem um importante espaço na biomedicina.

1.2.2. LECTINAS DE *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* E *Helianthus tuberosus*.

Pisum arvense L., é uma planta conhecida como ervilha forrageira, habitualmente utilizada como forragem para o gado. Pertence a classe das

Dicotiledôneas, a família das Leguminosas, e a subfamília Papilionoidea, tribo: Viceae, sendo sua lectina extraída de suas sementes (Silva *et al.*, 2000).

Bauhinia variegata L, é uma planta conhecida popularmente como pata de vaca, apresenta flores brancas ou rosas (dependendo da variedade). Pertence a família das Leguminosas, a subfamília das Caesalpinoideae, e a tribo Bauhinieae. As Bauhinias têm sido utilizadas popularmente como hipoglicemiante, como é o caso no Brasil, da *Bauhinia forticata*, e estudos demonstram que em ratos com diabetes induzida por streptozotocina ou alloxano, tiveram os níveis de glicemia reduzidos, quando receberam infusões de *Bauhinia candicans* (Lemus *et al.*, 1999). A lectina de *Bauhinea variegata* é extraída de suas sementes (Pinto, 2000).

Arum maculatum L, é uma planta conhecida popularmente como "Adão e Eva", originária do norte da Europa, e que quando mastigada, provoca queimadura e edema da mucosa buco-faríngea. Em contato com a pele pode também provocar dermatites (Boyce, 1993). A *Arum maculatum* é da família das Araceae, e a sua lectina é extraída dos tubérculos da planta (Van Damme *et al.*, 1995).

Helianthus tuberosus L, também conhecida como Jerusalém artichoke (alcachofra de Jerusalém), é encontrada na América do norte e no norte da Europa, e têm sido utilizada popularmente em diabetes e reumatismo (Duke, 1985). A *Helianthus tuberosus* é da família das Asteraceae, e a sua lectina é extraída dos tubérculos da planta. Esta lectina apresenta uma estrutura tetramérica, composta por quatro subunidades idênticas, de 15.5 KDa (Van Damme *et al.*, 1999).

2. LECTINAS E REAÇÃO INFLAMATÓRIA.

Como foi apresentado, as lectinas estudadas até hoje, têm demonstrado exercerem importantes efeitos sobre as células do sistema imune, estimulando-as a produzirem mediadores inflamatórios importantes, além de servirem de ferramentas para a compreensão do papel destas células e dos mecanismos de defesa contra agentes nocivos, *per si*.

2.1. REAÇÃO INFLAMATORIA.

Estímulos lesivos, independentes da sua natureza, seja ela química, física ou biológica, desencadeiam no organismo uma série de alterações funcionais e morfológicas de células, tecidos, vasos sanguíneos e linfáticos na área afetada, circunscrevendo a lesão provocada pelo estímulo irritativo (Robbins *et al.*, 1994). Essa reação denomina-se resposta imune inata, ou como é mais conhecida, reação inflamatória. É uma complexa cadeia de eventos que está envolvida nos processos de reparação e defesa, como também em doenças auto-imune, câncer, etc...

Didaticamente a resposta imune inata (inflamação) é descrita separadamente da resposta imune específica ou adaptativa (humoral), entretanto estas duas reações de defesa são em verdade interdependentes, onde a resposta imune inata sinaliza o perigo à resposta imune específica, e vice-versa (Luster, 2002), dependendo da natureza do agente agressor (Rang *et al.*, 1996).

A inflamação possui como sinais clínicos: calor, tumor, rubor, dor (Celsus, 30 a.C. - 38 d.C), e perda de função (Galeno, 129 – 201 d.C) [(Robbins *et al.*, 1994)], sendo dividida em uma fase aguda e uma fase crônica. Na fase aguda, ocorre uma cadeia de eventos vasculares, celulares e químicos, nos quais podemos enumerar: 1) liberação de mediadores químicos (ex: histamina, prostaglandinas E₂ e I₂); 2)

dilatação de arteríolas, capilares e vênulas, com aumento de permeabilidade vênular e aumento do fluxo sanguíneo; 3) exsudação de plasma, incluindo-se proteínas; migração de leucócitos (neutrófilos) para o foco inflamatório.

A níveis sistêmicos, dependendo da extensão do processo inflamatório, observamos variações de temperatura corporal, aumento de leucócitos no sangue (leucocitose, ou neutrofilia se envolver neutrófilos em preponderância), aumento de certas proteínas plasmáticas (proteínas de fase aguda), como por exemplo: proteína C-reativa; α_2 -macroglobulina; α_1 -antitripsina; fibrinogênio, e alguns componentes do sistema complemento, que ocorrem graças a ativação de uma cascata inflamatória, onde ocorre o envolvimento do sistema de cininas, sistema de coagulação, sistema complemento, cascata do Ácido araquidônico, produção de radicais de oxigênio e óxido nítrico (**Figura 3**).

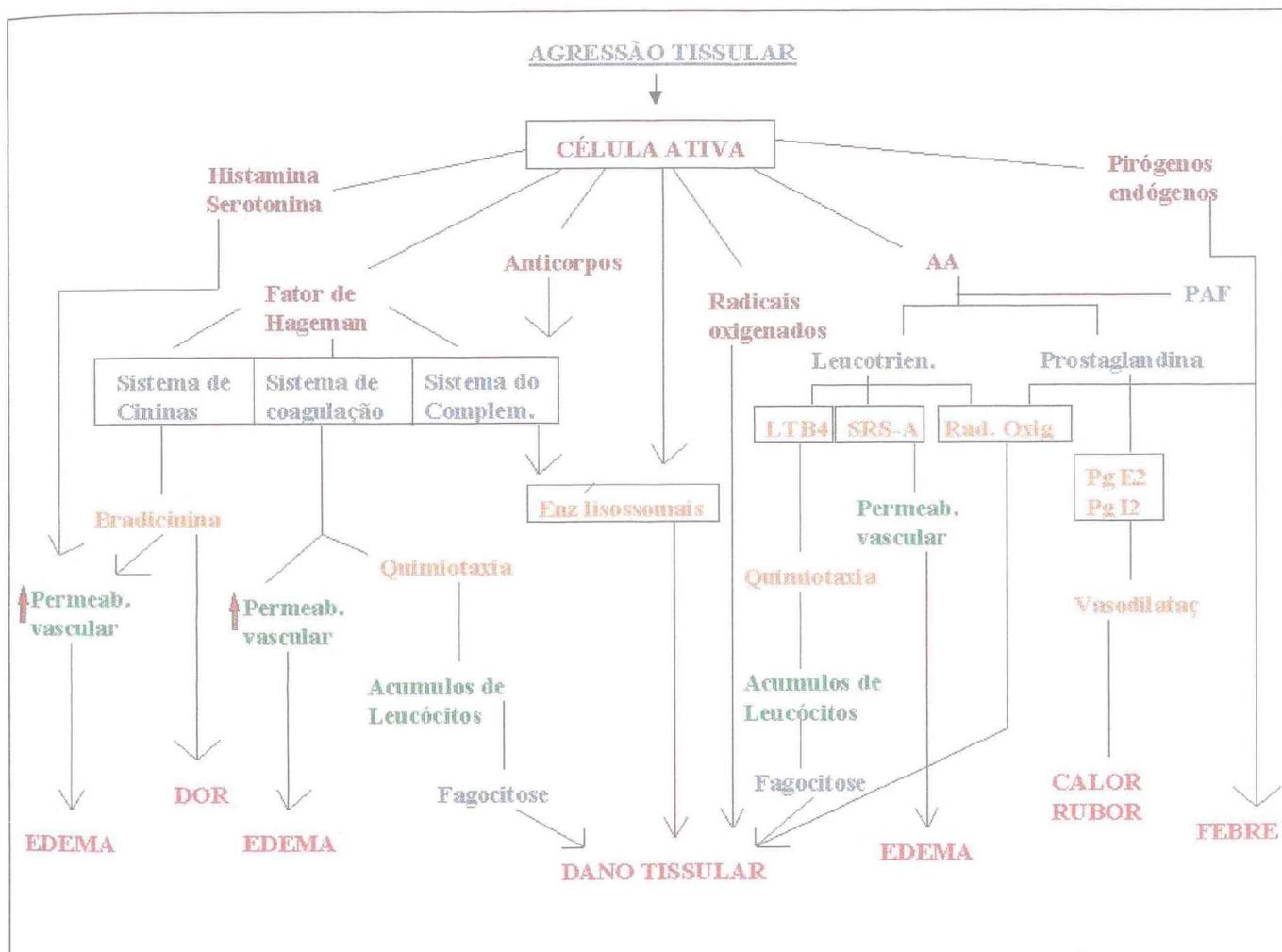
Em uma fase mais tardia (fase crônica), observamos histologicamente um infiltrado de linfócitos e macrófagos, e à proliferação de vasos sanguíneos e danos no tecido conjuntivo (Rang *et al.*, 1996).

2.2. PROCESSOS DA INFLAMAÇÃO AGUDA (resposta inata).

2.2.1. EVENTOS VASCULARES E CELULARES

Os eventos vasculares envolvem uma inicial dilatação de pequenas arteríolas aumentando o fluxo sanguíneo, também denominado estase do sangue, seguido de um aumento da permeabilidade de vênulas e exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas. Esses eventos são devidos a ativação das células residentes (macrófagos, mastócitos) nos tecidos onde ocorreu o dano inicial, que passam a

FIGURA 3. ESQUEMA ILUSTRATIVO DA CASCATA INFLAMATORIA.



liberarem certos mediadores químicos como a histamina e serotonina, sendo mantidos por outros mediadores que fazem parte da cascata inflamatória, como a bradicinina (sistema de cininas), PAF (fator ativador de plaquetas), fatores do sistema de coagulação, e prostaglandinas E_2 e I_2 (Rang *et al.*, 1996).

Nos eventos celulares da inflamação aguda, as células envolvidas são macrófagos, mastócitos e células endoteliais (nos tecidos), além de leucócitos e plaquetas presentes no sangue. Embora as plaquetas sejam conhecidas pela propriedade de formar trombos, na inflamação elas participam na geração de radicais livres e proteínas catiônicas pró-inflamatórias (Rang *et al.*, 1996).

Após a ativação das células residentes (macrófagos e mastócitos), segue-se a liberação dos mediadores, ativação das células endoteliais e recrutamento de leucócitos para o foco da inflamação, recrutamento esse denominado de quimiotaxia. No processo de quimiotaxia, o tipo de célula predominante no sítio da inflamação varia de acordo com o estágio da lesão e do tipo de estímulo. Na maioria das formas de inflamação aguda, os neutrófilos são as células que predominam no infiltrado durante as primeiras 6 - 24 horas, sendo substituídos por monócitos e linfócitos no período de 24 - 48 horas.

No foco de inflamação, os leucócitos fagocitam os agentes ofensores, matam bactérias e outros microorganismos e degradam tecidos necróticos e antígenos estranhos (BEVILACQUA *et al.*, 1994). Além disso, o acúmulo de neutrófilos no local inflamado contribui para os eventos vasculares da inflamação tais como aumento de permeabilidade com exsudação protéica, edema e lesão vascular (WEDMORE & WILLIAMS, 1981).

2.2.1. QUIMIOTAXIA

O termo quimiotaxia é utilizado para definir a reação de locomoção dos leucócitos em direção à um estímulo (substâncias químicas), difere um pouco do termo hapototaxia, onde a locomoção dos leucócitos segue um gradiente de concentração (Wilkinson, 1996).

A migração de neutrófilos segue uma série de etapas de interações com as células endoteliais antes de atingir o objetivo de chegar ao foco inflamado. A etapa inicial foi classicamente definida como marginção (Carter & Robinson, 1998). Este processo ocorre graças a interação de E e P-selectina, expressas na superfície das células endoteliais, mediada por estímulos, e de L-selectina já existente na superfície dos neutrófilos, com glicoconjugados da membrana de ambas as células. Seguido ao processo de marginção, a interação das selectinas aos glicoconjugados permite, a segunda etapa classicamente conhecida rolling, onde os neutrófilos rolam sobre as células endoteliais (Kieda, 1998).

Simultaneamente à expressão de selectinas, outras moléculas de adesão participam do processo de adesão dos neutrófilos às células endoteliais, como: ICAM-1 e 2 (do inglês: intercellular adhesion molecule); VCAM-1 e 2 (do inglês: vascular cell adhesion molecule); α_2 -integrinas; α_4 -integrinas; além de vários componentes da matrix dos tecidos conjuntivos (fibronectina, vitronectina, laminina e colágeno) [(Johnston & Kubes, 1999)]. As etapas finais do processo são a transmigração e a migração, onde os neutrófilos passam entre as células endoteliais e migram até o foco inflamado, passando assim a exercer seu papel de destruir os agentes agressores (**Figura 4**) [(BEVILACQUA *et al.*, 1994)].

2.2.3. FISILOGIA DAS CÉLULAS ENVOLVIDAS NA INFLAMAÇÃO.

a) MONÓCITOS/MACRÓFAGOS

A medula óssea produz células multipotentes mielóides que dão origem, na própria medula, aos granulócitos, eritrócitos, monócitos e plaquetas. Os monócitos fazem parte do sistema mononuclear fagocitário ou histiocitário, encontrando-se inicialmente no sangue, onde migram para os órgãos e tecidos conjuntivo, passando a serem chamados de macrófagos (Junqueira & Carneiro, 1995; Rang *et al.*, 1996). Nos tecidos, os monócitos diferenciam-se e recebem diferentes nomenclaturas como por ex: macrófagos pleurais e peritoneais (cavidades serosas), células de Kupffer (fígado), células microgliais (sistema nervoso central), macrófagos alveolares (pulmão), osteoclastos (osso), (Robbins *et al.*, 1994), podendo também sob certas condições, diferenciarem-se em células dendríticas (Keller, 2001).

Os macrófagos desempenham um papel fundamental em ambos, detecção e resposta à proteínas estranhas, células apópticas e células tumorais. Primeiramente devido a sua habilidade de fagocitar e destruir microorganismos, e pela capacidade de sinalizar outras células a participarem do processo (Linehan *et al.*, 2000; Klimp *et al.*, 2002). Os macrófagos expressam em sua membrana vários receptores de macrófagos capazes de participar dos processos de fagocitose contra microorganismos e células apópticas, onde podemos citar: CR1(CD35), CR3(CD11b-CD18), CR-4(CD11c-CD18), CD48, receptor manose, receptores scavenger (SR- AI, SR-AII, MARCO, CD36, LOX-1), MER, CD14 e $\alpha v \beta 3$ (Greenberg & Grinstein, 2002; Peiser *et al.*, 2002). Colaborando com os receptores responsáveis pela fagocitose, os microorganismos possuem em sua superfície uma grande quantidade de glicoconjugados que são reconhecidos pelas lectinas dos

macrófagos, permitindo assim a interação bactéria-macrófago (Medzhitow & Janeway, 1997).

Após o contato com as proteínas estanhas, os macrófagos passam a ser ativados, produzindo e liberando vários mediadores inflamatórios como citocinas e prostanoídes (Oliani, *et al.*, 2001), além de óxido nítrico (ON) e radicais de oxigênio (Assreuy *et al.*, 1994; Klimp *et al.*, 2002). A ativação dos macrófagos dá-se via diferentes estágios, acompanhada por específica expressão de proteínas, a serem secretadas, além de proteínas membranares, que podem produzir regulação sobre macrófagos em outro estado de ativação (Klimp *et al.*, 2002) e sobre outras células como mastócitos, células endoteliais, eosinófilos, neutrófilos e linfócitos.

Os principais mediadores celulares produzidos por macrófagos após sua ativação, mediando assim uma sinalização celular, são: Prostaglandina E₂ (PGE₂); leucotrieno - B₄ (LTB₄); Fator ativador de plaquetas (PAF); Óxido nítrico (Coleman, 2001); e citocinas (Rang *et al.*, 1996).

As citocinas produzidas por macrófagos inter-relacionadas a inflamação são: Interleucina 1 (IL-1); Fator de necrose tumoral- α (TNF- α); Interferon- γ (IFN- γ); (Cunha & Ferreira, 1986; Faccioli *et al.*, 1990; Ribeiro *et al.*, 1990; Rang *et al.*, 1996; Ribeiro *et al.*, 2000); Interleucina 8 (IL-8) produzida em humanos, que é quimiotática para neutrófilos [(Ribeiro *et al.*, 1991)], ou a proteína equivalente produzida em ratos e camundongo, CINC-1 (do inglês: cytokine-induced neutrophil chemoattractant) [(Duffy *et al.*, 2000)]; CINC-2 α ; CINC-2 β (Shibata *et al.*, 1995; Nakagawa *et al.*, 1996); Interleucina 10 (IL-10), Proteína inflamatória de macrófagos (MIP-1 e 2) (Duffy *et al.*, 2000); Fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) (Mitchell & Bucala, 2000); além das citocinas IL-15 e IL-18 que estão envolvidas nos processos

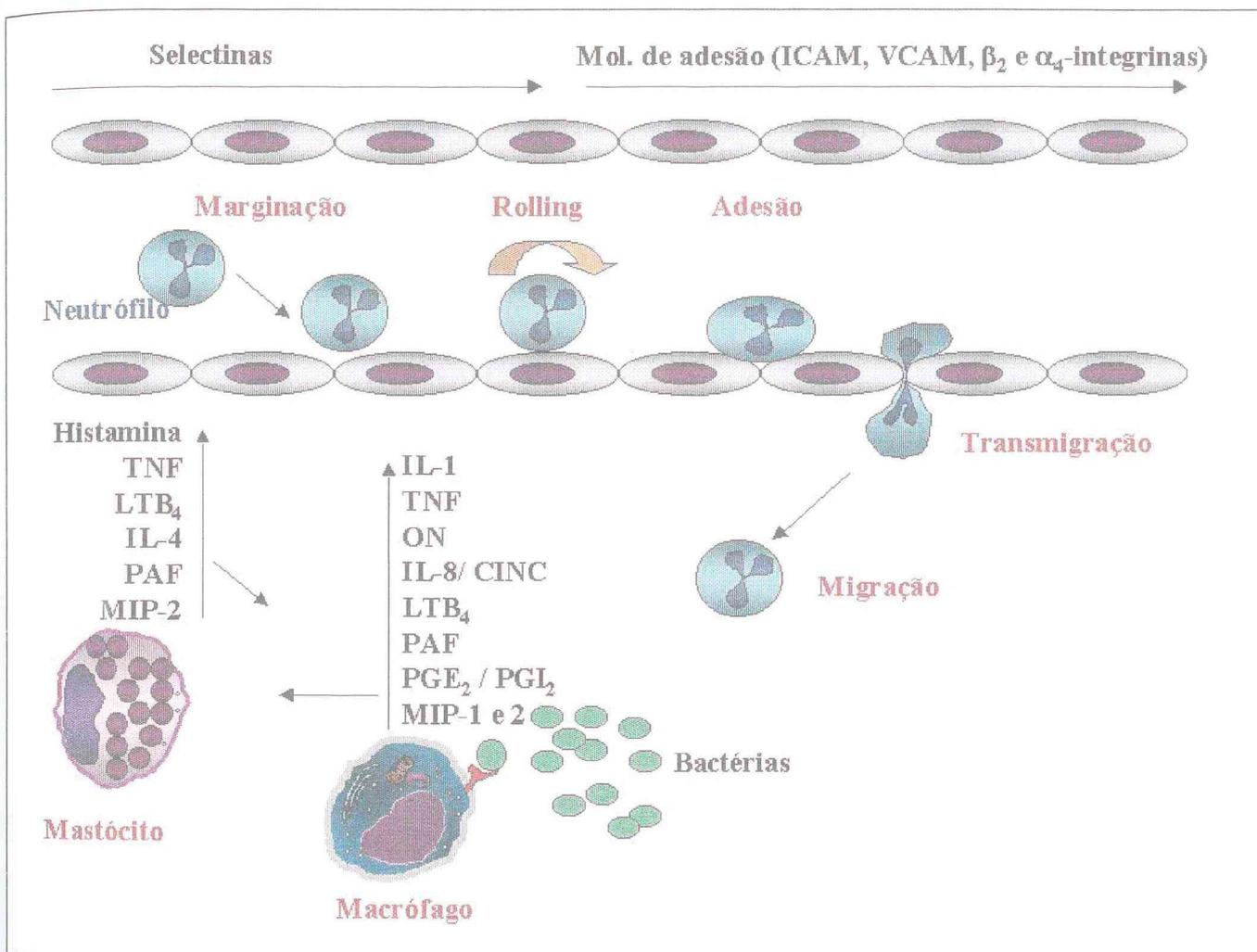


FIGURA 4. ETAPAS DO PROCESSO DE MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS.

Macrófagos e mastócitos produzem e liberam mediadores, que permitem o estabelecimento das etapas de marginação, *rolling*, adesão, migração e transmigração de neutrófilos para os tecidos afetados.

inflamatórios que ocorrem nas articulações, sendo detectadas nas mesmas concentrações de TNF- α (Liew & McInnes, 2001).

b) **MASTÓCITOS**

Mastócitos são células que têm sua origem na medula óssea, mas que migram aos tecidos, e quando maduras são encontradas distribuídas em todo o corpo, predominantemente localizadas próximas a vasos sanguíneos, nervos e sob o epitélio (Abbas, 2000). Estas células têm sido tradicionalmente consideradas como contribuidoras diretas da resposta imune inata e específica, desempenhando um importante papel na defesa orgânica. São células capazes de gerar e secretar mediadores que podem provocar mudanças vasculares e alterações celulares, afetar alguns fatores do plasma, e induzir migração de neutrófilos (primeiras horas) e de eosinófilos (após 24hs) [(Oliani *et al.*, 2001)].

A membrana de mastócitos é rica em receptores para IgE (Fc γ RI e Fc γ RII/CD23, respectivamente de alta e baixa afinidade para IgE) e componentes do sistema complemento. Quando ativadas, estas células sofrem degranulação liberando mediadores químicos (Buku *et al.*, 2001), que encontram-se já estocados em seus grânulos, como a histamina, serotonina (Rang *et al.*, 1996) e TNF- α (Beil *et al.*, 1994; Beil *et al.*, 1996; Schmidt-Choudhury *et al.*, 1996). Entretanto, mastócitos podem ser estimulados sem no entanto serem degranulados, como foi demonstrado por Ribeiro e colaboradores (1997), onde mastócitos estimulados por LTB₄ foram capazes de produzir um fator quimiotático para neutrófilos sem sofrerem degranulação. Uma vez estimulados por IgE via Fc γ RI ou não especificamente, por outra proteína, os mastócitos podem produzir e liberar uma série de mediadores

como: leucotrienos (LTB₄, LTC₄), prostaglandina (PGD₂), citocinas (TNF- α , GM-CSF, MIP-I, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8/CINC-I, e IL-13) (Banks & Coleman, 1996; Biedermann *et al.*, 2000; Wakahara *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2002), e superóxidos (O₂⁻) gerado pelo sistema de enzimas NADPH-peroxidase (Fukuishi *et al.*, 1997).

IL-4 liberado por mastócitos possui ainda um efeito autocrino, estimulando o mastócito a expressar receptores de alta e baixa afinidade para IgE (Fc γ RI e Fc γ RII/CD23), além de aumentar a expressão de IL-3 e IL-8 (Buckley *et al.*, 1995).

Após todos estes dados, fica evidente o papel de mastócitos não só no início da resposta imune, mas também na manutenção do processo, e na importante sinalização aos macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, células endoteliais e linfócitos.

Vários autores tem apresentado dados interessantes, dessa sinalização celular, no que concerne a liberação de citocinas, como vimos, e que certas dessas citocinas teriam um papel crucial na resposta imune, como por exemplo, IL-4 e IL-10, que regulariam negativamente macrófagos, parte via bloqueio de NF-kB (Banchereau & Rybak, 1994; Baldwin, 1996), ou TNF- α e IL-8/CINC-I, que induziriam a migração de neutrófilos (Oliveira *et al.*, 2002). Podemos acrescentar ainda dados interessantes da ação de mastócitos sobre macrófagos, onde alguns autores demonstraram que macrófagos fagocitam os grânulos liberados de mastócitos *in vitro* e *in vivo* (Ito *et al.*, 1998; Olliani *et al.*, 2001), utilizando microscopia de fluorescência e eletrônica, e além disso, Ito e colaboradores (1998) demonstraram que, após a ingestão dos grânulos, ocorre uma redução da expressão de iNOS, e que este fato deve-se a degradação de NF-kB, além de uma redução na expressão de RNAm para TNF- α .

c) NEUTRÓFILOS

Os neutrófilos (leucócitos polimorfonucleares, PMN) são os primeiros leucócitos do sangue que migram aos focos de inflamação. Entretanto sob condições normais estas células podem também migrar dos vasos aos tecidos (Wagner & Roth, 2000). São células fagocitárias, também originadas de células pluripotentes da medula óssea, que chegam ao sangue já "maduras", após terem passado cerca de cinco a sete dias na medula óssea. O processo de maturação dessas células é regulado por citocinas como GM-CSF (do inglês: granulocyte-monocyte colony stimulating factor), M-CSF (do inglês: macrophage colony stimulating factor), G-CSF (do inglês: granulocyte colony stimulating factor), IL-3 (Interleucina -3), além de eritropoítina (Robinson & Carter, 1992).

O processo pelo qual os neutrófilos migram ao foco inflamatório, é conhecido como quimiotaxia (descrito anteriormente), que não é uma função isolada e faz parte de uma complexa cadeia de eventos, sinalizadas por macrófagos, mastócitos e células endoteliais. Várias são as substâncias quimiotáticas capazes de induzir a quimiotaxia de neutrófilos. Dentre elas podemos citar: C5a (proteína derivada do sistema complemento); fMLP (do inglês: formyl methionyl leucyl phenylalanine, liberados de microorganismos); PAF (liberado de células endoteliais, plaquetas, macrófagos e de neutrófilos); as citocinas GM-CSF, TNF- α e as quimiocinas IL-8 (Interleucina -8) em humanos, e CINC-1 (do inglês: cytokine-induced neutrophil chemoattractant) em ratos e camundongos (Rang *et al.*, 1996, Duffy *et al.*, 2000).

Além destas, outras quimiocinas liberadas por células endoteliais e macrófagos de ratos, têm sido descritas como ativadoras e indutoras de migração de neutrófilos. Estas quimiocinas são: MIP-2 (do inglês: macrophage inflammatory protein-2), CINC-2 α e CINC-2 β (do inglês: cytokine-induced neutrophil chemoattractant 2 -alpha e -beta) [(Shibata *et al.*, 1995; Nakagawa *et al.*, 1996)]. O

leucotrieno B₄ (LTB₄) induz migração de neutrófilos de maneira indireta, induzindo a liberação de um fator quimiotático (Ribeiro *et al.*, 1997).

O principal motivo pelo qual os neutrófilos são recrutados aos focos inflamatórios é fagocitar as bactérias, partículas, células mortas, etc..., pela liberação de fosfatase ácida e outras enzimas lisossomiais, peroxidase (mieloperoxidase), proteínas básicas (catiônicas) ricas em argenina, e glicosaminoglicanas sulfatadas (Robinson & Carter, 1992; Junqueira e Carneiro, 1995).

Os neutrófilos liberam ainda peróxido de hidrogênio e ânions superóxidos, também conhecidos como ROS (do inglês: reactive oxygen species), e a liberação de produtos oxigenados nos compartimentos extracelulares, provocam dano celular e tissular (Burg & Pillinger, 2001; Swain *et al.*, 2002). De maneira geral, este processo de dano tissular é limitado pela indução da apoptose dos neutrófilos, seguida pela fagocitose das partículas e tecidos mortos por células fagocitárias (ex. fibroblastos e macrófagos). Entretanto as citocinas IL-1, IL-2, TNF- α , IL-15, IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, IL-6 e IL-8, além de LPS, podem prolongar a sobrevivência dos neutrófilos, mediados pela ativação de NF-kB, mantendo assim o processo inflamatório (Akgul *et al.*, 2001).

d) CÉLULAS ENDOTELIAIS

As células endoteliais constituem uma fina camada de células localizada na interface entre o tecido e a corrente sanguínea. Estas células possuem um importante papel nos processos de angiogênese, inflamação, metástases, e doenças vasculares (Yang *et al.*, 2002).

Estas células expressam uma série de receptores para histamina, acetilcolina, interleucina-1(IL-1) entre outros, mediando assim os eventos vasculares da inflamação e induzindo a expressão de moléculas de adesão e selectinas (VCAM-1, ICAM-1 e selectinas-E e -P) estimulados por TNF- α , IL-1 (Rang *et al.*, 1996; Kieda, 1998;). Outras citocinas como interleucina-4 (IL-4) e interleucina-13 (IL-13) também atuam sobre células endoteliais induzindo também a expressão de VCAM-1. IL-4 também aumenta a migração de linfócitos T através da camada de células endoteliais, e aumenta a adesão de linfócitos B as estas células (Tudor *et al.*, 2001). Dentre os mediadores produzidos pelas células endoteliais, após sua ativação, podemos citar: GM-CSF, IL-8, TNF- α , prostaciclina (PGI₂), histamina, endotelina, PAF, ROS (Swain *et al.*, 2002).

2.2.4. PRINCIPAIS AÇÕES DOS MEDIADORES LIBERADOS PELAS CÉLULAS ENVOLVIDAS NA INFLAMAÇÃO

Como vimos, uma série de mediadores são liberados por macrófagos, mastócitos, células endoteliais e neutrófilos na resposta imune inata, e desencadeiam toda a série de eventos acima vistos. Estes mediadores serão listados na **tabela 1**, para nos dar uma visão mais ampla do processo.

TABELA 1 – PRINCIPAIS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

<u>MEDIADOR</u>	<u>FUNÇÃO</u>	<u>FONTE</u>
HISTAMINA	-Induz vasodilatação -Aumento de permeabilidade vascular -Desencadeia reação de hipersensibilidade, além de outras funções a níveis de estômago e coração	Mastócitos (Rang <i>et al.</i> , 1996)
SEROTONINA	-Aumento da permeabilidade vascular	Plaquetas e mastócitos (Robins <i>et al.</i> , 1994)
NO	-Induz vasodilatação -Citotóxico para as bactérias -Inibe agregação de plaquetas	Macrófagos Células endoteliais (Coleman, 2001);
Superóxidos (O ₂ ⁻)	-Aumentam a permeabilidade membranas -Modulam a atividade de proteínas quinase -Ativam NF-κB de neutrófilos	Neutrófilos, células endoteliais e Macrófagos (Swain <i>et al.</i> , 2002)
C5a **	-Quimiotático para neutrófilos	Macrófagos (membrana) Célula endoteliais (especializadas) (Wagner & Roth, 2000)
Fator ativador de plaquetas (PAF)	-Induz vasodilatação -Aumento de permeabilidade vascular -Quimiotático para monócitos e eosinófilos -Ativa a produção de eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos)	Células endoteliais Plaquetas Neutrófilos Macrófagos (Rang <i>et al.</i> , 1996; Wagner & Roth, 2000)
Eicosanóides		
Prostaglandina E ₂ (PGE ₂)	-Medeiam a vasodilatação -Promovem hiperalgesia	Macrófagos (Rang <i>et al.</i> , 1996)
Prostaciclina (PGI ₂)	-Medeiam a vasodilatação -Promovem hiperalgesia -Bloqueiam a agregação plaquetária	Células endoteliais (Robins <i>et al.</i> , 1994)
Leucotrieno B ₄ (LTB ₄)	-Estimula macrófagos e neutrófilos a liberarem um fator quimiotático para neutrófilos -Estimulam macrófagos e linfócitos a produzirem citocinas	Macrófagos Mastócitos Neutrófilos Basófilos (Rang <i>et al.</i> , 1996; Ribeiro <i>et al.</i> , 1997)
Leucotrieno C ₄ (LTC ₄)	-Aumenta a permeabilidade vascular -Induz broncoconstricção	Mastócitos (Banks & Coleman, 1996)
Citocinas e quimiocinas		
Interleucina -1 (IL-1)	-Estimuladoras de linfócitos, macrófagos, mastócitos fibroblastos, e células endoteliais. -Induz produção de varias citocinas -Induz produção de NO -Ativa fosfolipase A ₂ -Induz febre	Macrófagos/monócitos (Rang <i>et al.</i> , 1996)
TNF-α	- Induz síntese de prostaciclina, moléculas de adesão - Induz síntese de citocinas e fatores quimiotáticos - Ativa fibroblastos, osteoclastos, induz febre	Macrófagos, mastócitos e Células endoteliais (Rang <i>et al.</i> , 1996)
Interleucina -3 (IL-3)	-Atua sobre células pluripotentes, estimulando o desenvolvimento de granulócitos, macrófagos, megacariócitos, mastócitos, eritrócitos; -Ativa eosinófilos .	Mastócitos Linfócitos T (Schrader, 1994)
Interleucina -4 (IL-4)	-aumenta a expressão de IL-3 e IL-8 de mastócitos -Inibidor da expressão de IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α, IFN-γ e -β de macrófagos -Inibe a produção de superóxidos e PGE ₂ de macrófagos -Induz expressão de IL-6 e IL-8 de células endoteliais.	Mastócitos Linfócitos T (Banchereau & Rybak, 1994; Buckley <i>et al.</i> , 1995).
Interleucina 10 (IL-10)	-Inibidor a expressão de IL-1, GM-CSF, TNFα, IL-6, IL-8, IL-12 de macrófagos -Inibe a expressão de algumas citocinas de células T -Inibe a produção de anticorpos	Macrófagos (Go <i>et al.</i> , 1990; Mosmann, 1994; Pecanha <i>et al.</i> , 1993)

Continuação da tabela 1		
IL-13	-Possui atividades semelhantes a IL-4	Mastócitos (Wakahara <i>et al.</i> , 2001)
IL-15	- Relacionada com inflamação articular	Monócitos/macrófagos (Liew & McInnes, 2001)
IL-18	- Relacionada com inflamação articular	Monócitos/macrófagos (Liew & McInnes, 2001)
Interferon- γ (IFN- γ)	-Induz expressão de TNF- α em macrófagos	Linfócitos T e Macrófagos (Cunha & Ferreira, 1986)
GM-CSF	-Ativa neutrófilos e macrófagos -Quimiotático para neutrófilos	Macrófagos (Rang <i>et al.</i> , 1994)
Interleucina-8 (IL-8)	-Quimiotático para neutrófilos -Ativa macrófagos	Macrófagos, Mastócitos Células endoteliais (Ribeiro <i>et al.</i> , 1991; Rang <i>et al.</i> , 1994)
CINC-1; CINC-2 α ; CINC-2 β	-Quimiotaxia de neutrófilos (roedores)	Macrófagos e Mastócitos (Shibata <i>et al.</i> , 1995; Nakagawa <i>et al.</i> , 1996)
MIP-1	-Quimiotaxia de neutrófilos	Macrófagos e Neutrófilos Linfócitos T e B (Schall, 1994)
MIP-2	-Quimiotaxia de neutrófilos	Macrófagos e Mastócitos (Biedermann, <i>et al.</i> , 2000; Duffy <i>et al.</i> , 2000);)

3. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

A utilização das lectinas vegetais na clínica, bem como na pesquisa médica, tem demonstrado a grande importância do uso destas proteínas, além de ressaltarem a importância da crescente investigação sobre novas lectinas, com intuito de não somente esclarecer o mecanismo de certas patologias, mas também de encontrar o tratamento ou adjuvantes para tais tratamentos.

Em outros setores como as ciências agrárias, os estudos destas lectinas propiciam a utilização das mesmas como “agrotóxicos” naturais, não ofensivos ao corpo humano, como ingredientes de rações para a piscicultura e agropecuária, favorecendo assim uma melhoria de crescimento e de defesas desses animais. Por outro lado, estes estudos permitem inferir que certos frutos e legumes ricos em determinadas lectinas, consumidos pelo homem, sejam indicados também como meio de estimular nosso sistema imune. Por isso a grande maioria dos lectinólogos vêem nestas proteínas, as respostas a muitas questões médicas, e classificam como promissor o futuro das pesquisas nesta área.

Entretanto, o universo das lectinas é bem vasto, e ainda não totalmente esclarecido, sendo a cada dia isoladas novas lectinas que necessitam de terem suas funções nas diversas áreas, esclarecidas e caracterizadas. As lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus* foram isoladas e caracterizadas sob o aspecto bioquímico, sem no entanto terem sido ainda avaliadas as atividades biológicas. A única exceção, é que Andrade e colaboradores (1999) demonstraram que a lectina de *Pisum arvense* é capaz de estimular macrófagos a liberarem óxido nítrico *in vitro*.

Nosso laboratório tem contribuído na compreensão das atividades biológicas, visando sempre estabelecer as atividades pró ou anti-inflamatórias das lectinas. Na grande maioria das vezes, as lectinas por nós estudadas, não tem sido ainda investigadas sob os aspectos biológicos, de maneira que fazemos um trabalho de base na investigação destas moléculas. É dentro do contexto das importantes descobertas sobre a caracterização e emprego das lectinas em benefício do homem, e do trabalho que nosso grupo vem realizando, que baseamos nosso trabalho.

Desta maneira, o objetivo geral deste trabalho foi de investigar a atividade pró-inflamatória das lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*, em neutrófilos de ratos, além de investigar os possíveis mecanismos envolvidos, bem como a participação de células residentes neste processo, visando também identificar em quais células do sistema imune estas lectinas ligam mais avidamente, nos permitindo traçar uma correlação da interação das lectinas aos carboidratos membranares das células, e sua capacidade de desencadear a estimulação das mesmas.

Para tanto, os objetivos específicos deste trabalho foram:

1. Investigar, *In vivo*, a atividade pró-inflamatória, das lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*, na indução de migração de neutrófilos em cavidades peritoneais de ratos.

2. Investigar, *in vitro*, a atividade quimiotática das lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*, sobre neutrófilos.

3. Estudar o papel de células peritoneais residentes (macrófagos e mastócitos) na atividade indutora de migração de neutrófilos das lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*.

4. Investigar a interação das lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus* em macrófagos, monócitos, mastócitos, e neutrófilos.

II. MATERIAIS E MÉTODOS



1. ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos ou fêmeas, com massa corpórea entre 150 e 250 g, e ratos idosos pesando em média 500g. Os animais foram procedentes do Biotério Central do Campus do Pici, na Universidade Federal do Ceará (UFC), e mantidos no biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da mesma universidade, ou do Biotério da l'Université des Sciences et Technologie de Lille (França), e foram mantidos no biotério setorial do Laboratoire de Chimie Biologique da universidade francesa. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, em número de cinco a seis, sob condições de temperatura (18-26°C) e ciclo claro/escuro controlados. Receberam ração balanceada e água *ad libitum*. A manipulação, acondicionamento e realização dos experimentos laboratoriais foram de acordo com as normas estabelecida no guia para utilização de animais em laboratórios, criado pelo "Council of American Psychological Society".

2. LECTINAS

As lectinas foram isoladas e purificadas no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, e no Laboratoire de Chimie Biologique da Université des Sciences et Technologies de Lille (France).

A lectina de *Pisum arvense*, da família das Leguminosas, que é glicose/manose específica, foi isolada por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-100 (Silva et al., 2000).

A lectina de *Bauhinia variegata*, da família das Leguminosas, que é

lactose/galactose específica, foi isolada por cromatografia de afinidade em coluna Sepharose/Lactose (Pinto, 2000)

As lectinas de *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*, das famílias Araceae e Asteraceae, respectivamente, que são glicose/manose específicas, foram isoladas por cromatografia de afinidade em coluna Sepharose/Manose 4B (Van Damme et al., 1995; Guillot et al., 1991).

3. DROGAS E DISSOLUÇÕES

- α -D-Manose (Sigma)
- Azul de toluidina
- Azul de Tripán
- Bicarbonato de sódio
- BSA
- Carbonato de sódio
- Colecalciferol (Sigma)
- Cloreto de Sódio 0.9% - "Salina" (NaCl – 0.15M; Merck)
- Coluna PD10
- Composto 48/80 (Sigma)
- EDTA
- Éter etílico
- etilenoglicol
- FITC
- Glucose
- Hanks (Sigma)

- Hematoxilina eosina (Hema 3)
- Heparina 5.000 UI/ml (Roche)
- Histopaque 1077
- Histopaque 1191
- Iodado de propídio
- Lactose
- n-Butanol
- N-formil-metil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina (fMLP) (Sigma)
- PBS de Dubellcos (Sigma)
- Penicilina
- Percoll (Pharmacia)
- RPMI 1640
- Solução de Turk*
- Streptomicina
- Tioglicolato (Sigma)

A maioria das substâncias foi preparada em solução estéril de NaCl 0,15 M ou água Milli-Q.

*Solução de Turk:

Ac. acético glacial (P.A.)..... 20mL
Violeta genciana (0.4%)..... 2mL
Água destilada (QSP)..... 1L

4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Para a investigação do efeito pró-inflamatório das lectinas na quimiotaxia de

neutrófilos, visando a participação das células residentes, foram utilizados modelos *in vivo* (em ratos) de peritonite, e *in vitro*, foram feitos ensaios de quimiotaxia de neutrófilos em microcâmara de 48 poços, além de culturas de macrófagos também estimulados pelas lectinas. A investigação da interação das lectinas de *Pisum arvense* (PAL), *Bauhinia variegata* (BVL), *Arum maculatum* (AMA) e *Helianthus tuberosus* (HTA), aos macrófagos/monócitos, mastócitos e neutrófilos, foram realizados experimentos em citômetro de fluxo.

4.1 – INVESTIGAÇÃO DO EFEITO PRÓ-INFLAMATÓRIO DAS LECTINAS DE *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*, NA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E A PARTICIPAÇÃO DAS CÉLULAS RESIDENTES NESTE PROCESSO.

Para a investigação do efeito pró-inflamatório das lectinas PAL, BVL, AMA e HTA na quimiotaxia de neutrófilos, foram realizados, *in vivo*, em ratos, experimentos de migração de neutrófilos, utilizando o modelo de peritonite. O papel das células residentes neste processo, foi estudado através da alteração do estado natural da cavidade peritoneal, pela depleção das células residentes mediante lavagem das cavidades peritoneais; aumento do número de macrófagos pelo tratamento com tioglicolato (Tg) e depleção de mastócitos pelo tratamento com o composto 48/80. Estes ensaios de indução da migração de neutrófilos (modelo de peritonite), depleção de células residentes por lavagem da cavidade peritoneal, o aumento da população de macrófagos pelo tratamento com tioglicolato e depleção de mastócitos por 48/80, são modelos clássicos utilizados por nosso laboratório e por outros grupos ao longo dos últimos anos (Souza & Ferreira, 1985; Cunha & Ferreira, 1986;

Faccioli *et al.*, 1990; Ribeiro *et al.*, 1991; Ribeiro *et al.*, 1997; Assrey *et al.*, 1997; Alencar *et al.*, 1999).

No estudo *in vitro* foram realizados ensaios de quimiotaxia de neutrófilos em microcâmara de Boyden (Neuroprobe Inc. Instruments for Biomedical Research), e culturas de macrófagos estimulados pelas lectinas, com o objetivo de avaliar si as lectinas possuíam capacidade de estimular a migração de neutrófilos diretamente e de estimular os macrófagos, a liberarem fatores quimiotáticos.

A investigação do efeito lectínico das lectinas, ou seja, a capacidade dessas lectinas ligarem-se aos carboidratos das células e induzirem ou não migração de neutrófilos, foi investigada pela pré-incubação das lectinas com seus açúcares específicos, visando assim bloquear os sítios lectínicos e reduzir o efeito encontrado.

4.1.1 - MODELO DA PERITONITE

a) EFEITO DA INJEÇÃO DAS LECTINAS PAL, BVL, AMA E HTA, NA CAVIDADE PERITONEAL DE RATOS.

Ratos pesando entre 150 e 200g, foram injetados intraperitonealmente (i.p.) com 1mL das lectinas PAL (100, 200 e 300 μ g/mL) ou BVL (100, 200 e 300 μ g/mL) ou AMA (80, 200 e 500 μ g/mL) ou HTA (80, 200 e 500 μ g/mL) diluídas em salina estéril (0.9%), ou salina sozinha, o qual foi considerado como o controle do experimento. Após 4h, os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical, sob anestesia com éter etílico. Em seguida, as cavidades peritoneais foram lavadas injetando-se 10 mL de salina contendo 5 UI/mL de heparina. Os abdomens dos animais foram levemente massageados, expostos, e através de uma incisão, foram

coletados cerca de 6 mL do fluido peritoneal, com pipeta Pasteur de plástico (Ribeiro *et al.*, 1991).

Foram realizadas as contagens totais e diferenciais das células, baseadas no método de Souza & Ferreira (1985). Para tanto, 20 µl do material coletado de cada animal, foram diluídos em 380 µl de solução de Turk (diluição 1:20) e usados para a contagem total das células, em câmara de Neubauer. Para a contagem diferencial das células, foram utilizados 25 µl do exsudato restante na preparação dos esfregaços, em citocentrífuga, a 400 x g, durante 10 min, sendo estes corados pelo método da hematoxilina-eosina (corante HEMA 3). As células foram examinadas em microscópio óptico através de objetiva de imersão em óleo (aumento de 100 vezes), onde foram contadas 100 células em cada lâmina, diferenciando-se três tipos celulares: neutrófilos, eosinófilos e mononucleares. O número de neutrófilos foi estimado multiplicando-se o percentual encontrado destas células (contagem diferencial) pelo número total de leucócitos (contagem total), dividido por 100. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. do número de neutrófilos/mL do lavado peritoneal e comparados àqueles obtidos dos animais que foram injetados com salina estéril, em substituição às proteínas.

b) INVESTIGAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DOS AÇUCARES, NA INDUÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL DE RATOS INDUZIDA PELAS LECTINAS PAL, BVL, AMA, HTA:

As lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberos*, foram incubadas por 30 minutos a 37°C com seus açúcares

ligantes específicos, ou seja, α -D-manose, lactose, α -D-manose e α -D-manose, respectivamente, na concentração de 0.1M. Após esta etapa, os animais receberam por via intraperitoneal 1mL de salina, ou das lectinas todas na concentração de 200 μ g/mL, ou das lectinas na concentração de 200 μ g/mL pré-incubadas com seu açúcar específico, ou o açúcar sozinho, na concentração de 0.1M.

Quatro horas após a injeção dos estímulos acima citados, seguiu-se o protocolo de coleta do exudato peritoneal citado no item 4.1.1(a).

4.1.2 - ALTERAÇÕES NA POPULAÇÃO DE CÉLULAS RESIDENTES

A população normal de células da cavidade peritoneal de ratos foi alterada com o objetivo de nos permitir o estudo do envolvimento de células residentes na indução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida pelas lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*. Para tanto, as seguintes metodologias foram empregadas:

a) REDUÇÃO DA POPULAÇÃO DE CÉLULAS PERITONEAIS RESIDENTES PELA LAVAGEM DA CAVIDADE PERITONEAL

Os animais foram anestesiados com éter etílico e após assepsia com álcool iodado, três agulhas hipodérmicas foram inseridas na cavidade abdominal dos mesmos: uma localizada próxima ao esterno e duas na região inguinal. Em seguida, 30 mL de uma solução estéril de salina, foram administrados através do acesso próximo ao esterno. A cavidade peritoneal foi então delicadamente massageada durante um minuto, e o fluido peritoneal coletado através do acesso localizado na região inguinal. Esta operação foi repetida três vezes, sendo a recuperação da

população de mononucleares acima de 80%. Sempre que amostras de sangue eram visualizadas nos fluidos de lavagem, estes eram descartados. Os animais controle (falsos lavados) foram manipulados da mesma forma, ou seja, as agulhas foram inseridas, sem, no entanto haver administração ou retirada de líquido. A população peritoneal de células mononucleares foi então estimada, 30 minutos após, através da injeção de 10 mL de salina heparinizada, conforme descrito no modelo da peritonite, e comparada aos animais que tiveram suas cavidades lavadas (Ribeiro *et al.*, 1997).

Os animais experimentais (falsos lavados ou lavados) receberam as lectinas PAL, BVL, AMA, ou HTA (200µg/mL) ou fMLP (10×10^{-10} moles) intraperitonealmente, 30 minutos após a lavagem. A migração de neutrófilos induzida pelas substâncias testadas foi avaliada 4 horas após as injeções i.p. e comparada à dos animais controle que receberam salina em lugar do estímulo (Sal). Os grupos lavados foram comparados ao falsos lavados.

b) AUMENTO DA POPULAÇÃO DE MACRÓFAGOS RESIDENTES PELO TRATAMENTO COM TIOGLICOLATO

Com o objetivo de aumentar a população de macrófagos residentes, e de acordo com a metodologia descrita por Ribeiro e colaboradores (1991), os animais receberam 10 mL de tioglicolato (Tg; 3% m/v) através de injeção intraperitoneal. Quatro dias após a injeção, os macrófagos peritoneais foram coletados, a contagem do número de células realizada e, comparada ao número obtido do grupo de animais não tratados (controle).

As lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e

Helianthus tuberosus (200µg/mL), foram administradas i.p. nos animais controle e nos animais tratados com tioglicolato. A migração de neutrófilos foi então avaliada 4 horas após, como descrito no item 4.1.1(a). O número de células obtido dos animais injetados com as lectinas e tratados com Tg foi comparado àquele dos animais controles (apenas injetados com as lectinas). A migração de neutrófilos dos animais que receberam as lectinas foi comparada àquela dos que receberam salina estéril i.p.

No grupo que recebeu o pré-tratamento com tioglicolato foi observado no lavado peritoneal um número residual de neutrófilos e, portanto, este número foi subtraído daquele obtido dos animais tratados com tioglicolato e as lectinas.

c) DEPLEÇÃO DA POPULAÇÃO DE MASTÓCITOS PELO TRATAMENTO COM O COMPOSTO 48/80

Seguindo o método descrito por Di Rosa e colaboradores (1971), os animais foram tratados intraperitonealmente com o composto 48/80 durante quatro dias consecutivos a intervalos de 12 horas. Nos três primeiros dias, receberam 0,6 mg/kg, e no quarto dia, 1,2 mg/kg. Cinco dias após o início do tratamento, o fluido peritoneal foi coletado e a depleção de mastócitos avaliada. Para tanto, o fluido celular foi diluído (1:20) em azul de toluidina, deixado em presença com o corante durante 2-3 minutos e a contagem do número de células realizada em microscópio ótico (objetiva com aumento de 40 vezes) utilizando câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi avaliada pela observação do número de mastócitos íntegros ou degranulados e ainda pela presença de células contaminantes. O material era descartado quando apresentava níveis de contaminação acima de 5%. Os resultados foram comparados

aos do grupo de animais não tratados com o composto 48/80.

As lectinas PAL, BVL, AMA ou HTA (200µg/mL), foram administradas, intraperitonealmente, nos animais remanescentes (controle e tratados com o composto 48/80), respectivamente. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 horas após e os resultados comparados aos controles respectivos.

4.1.3 – AVALIAÇÃO DO EFEITO DA INJEÇÃO DO SOBRENADANTE DE CULTURAS DE MACRÓFAGOS DE RATOS, PRÉ-ESTIMULADAS COM AS LECTINAS DE *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* E *Helianthus tuberosus*, SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS.

Com o objetivo de investigar o papel dos macrófagos na indução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos, estimuladas pelas lectinas, macrófagos de ratos foram isolados, cultivados em meio apropriado e estimulados com as lectinas, sendo então injetado o sobrenadante destas culturas, na cavidade peritoneal dos ratos, para ser observada ou não a indução da migração dos neutrófilos.

4.1.3.1. ISOLAMENTO DOS MACRÓFAGOS.

Para o isolamento de macrófagos, seguiu-se a metodologia descrita por Cunha & Ferreira (1986). Os ratos foram tratados intra-peritonealmente (i.p.) com 10 mL de tioglicolato (3% m/v). Quatro dias após, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical sob anestesia, e imediatamente após, foram injetados i.p. 10 mL de meio de cultura RPMI 1640, pH 7.4, contendo 5 UI/mL de heparina. Em

seguida, após leve massagem no peritônio, cerca de 70% do volume injetado foi coletado sob condições estéreis (exsudato).

Após a coleta do exsudato peritoneal, as células foram lavadas duas vezes por centrifugação a 100 x *g* durante 5 minutos, sendo o precipitado final ressuspenso em 1 mL de RPMI 1640. Sempre que se observava a presença de hemácias, as células eram centrifugadas, o sobrenadante aspirado e adicionava-se 1 mL de água Milli-Q por 20 segundos, e imediatamente após, 330 μ L de NaCl à 3.6%. Seguia-se então uma nova centrifugação e as células eram então ressuspendidas em 1 mL de RPMI 1640. A quantificação das células foi realizada em câmara de Neubauer, após diluição (1:20) em solução de Turk e, finalmente as células foram diluídas em RPMI, para uma concentração final de 10⁶ células/mL.

4.1.3.2. CULTURA DE MACRÓFAGOS E PREPARAÇÃO DO SOBRENADANTE PARA INJEÇÃO NA CAVIDADE PERITONEAL DOS RATOS.

Os macrófagos de ratos foram aplicados em placas de cultura de 24 poços (1 mL/poço) contendo 10⁶ células cada. A seguir, o material foi incubado a 37°C em estufa com 5% de CO₂ durante 1 hora para ocorrer a adesão dos macrófagos à placa. Ao final desse período, o sobrenadante da cultura foi descartado e as células aderidas foram lavadas com 1 mL de RPMI 1640. O mesmo volume do meio foi adicionado e a cultura foi mantida à 37°C em estufa com 5% de CO₂ por 24 horas para adesão total das células.

Após 24 horas, os macrófagos não aderidos foram removidos da placa por três lavagens com RPMI 1640. Sendo então os macrófagos aderidos, incubados ou não com 1 mL da solução contendo as lectinas PAL, BVL, AMA ou HTA, (300 μ g/mL)

durante uma hora. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e a monocamada de macrófagos lavada por mais 3 vezes. Nova incubação foi feita com 1,5 mL de RPMI 1640 durante 3 horas, para possível liberação dos fatores quimiotáticos. Após este período, o material contendo as substâncias liberadas da cultura de macrófagos foi coletado, centrifugado a $100 \times g$ durante 5 minutos e o sobrenadante obtido, injetado em animais normais (1 mL/i.p.). Após 4h, foi mensurada a quantidade de neutrófilos que migraram para a cavidade peritoneal dos ratos (**Figura 5**) (Alencar, *in* Tese de doutorado, 2001).

Ao final de cada cultura de macrófagos, a viabilidade celular foi analisada através da técnica do corante azul de tripan. Para tanto era feita uma raspagem das células aderidas na placa de cultura, as quais eram ressuspensas em 200 μ L de meio RPMI 1640. Desta suspensão, eram retirados 20 μ L e adicionados a 5 μ L do corante azul de tripan, em lâmina de microscopia. A análise era feita por microscopia óptica, com base na morfologia celular e na impregnação do corante. Assim, identificava-se as células com aspecto fluorescente como sendo as células viáveis e as coradas em azul representavam as células não viáveis.

4.2 INDUÇÃO DE MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS *IN VITRO* PELAS LECTINAS DE *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* E *Helianthus tuberosus*.

a) ISOLAMENTO DOS NEUTRÓFILOS:

Neutrófilos humanos viáveis (90-95% de pureza) foram obtidos de sangue venoso heparinizado de indivíduos sadios, através de fracionamento em gradiente

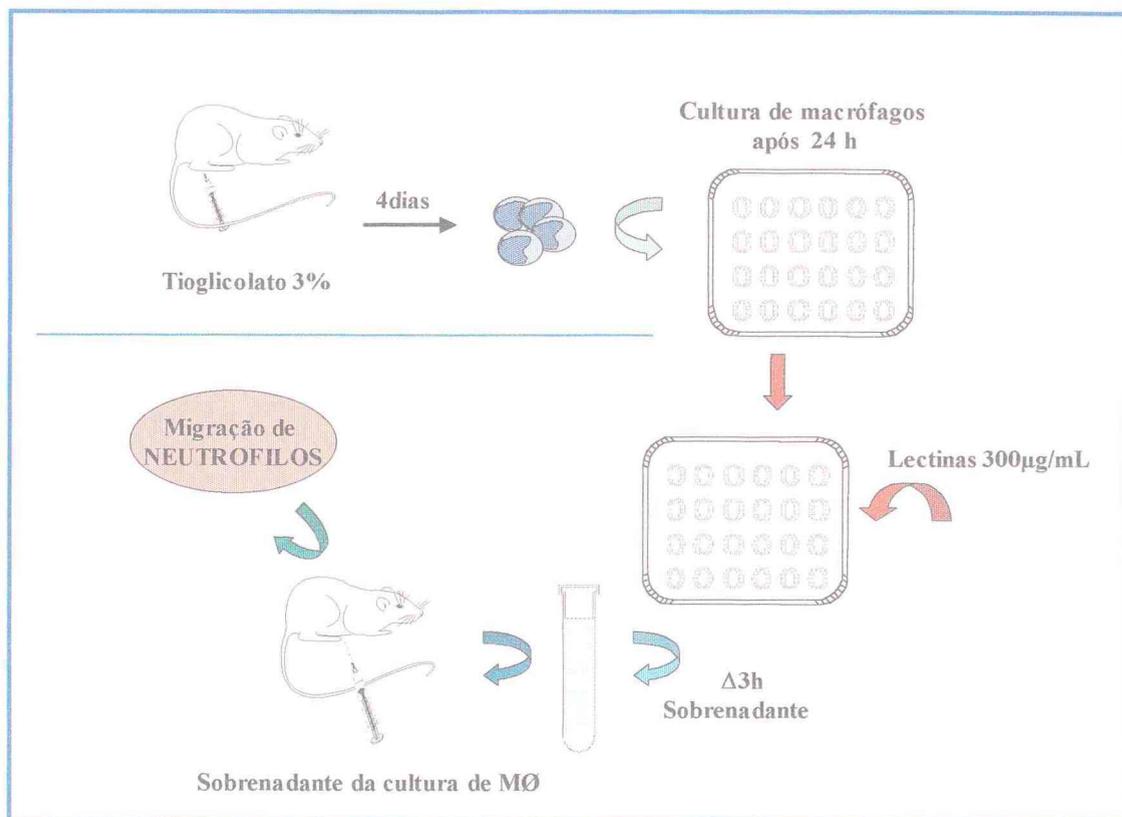


Figura 5. Manuseio do sobrenadante de macrófagos. Macrófagos de ratos foram coletados de ratos, colocados em cultura e estimulados com as lectinas por 60 min. A cultura foi lavada e 1.5mL de RPMI 1640 foi adicionado por 3h e os sobrenadantes foram coletados e injetados em ratos normais. A migração de neutrófilos foi analisada 4h após.

de Histopaque 1077 e Histopaque 1119. Para tanto, 3 mL de Histopaque 1119 foram pipetados em um tubo de Falcon (15 mL), e em seguida mais 3 mL de Histopaque 1077 foram adicionados com o cuidado de não misturar as duas camadas. Seis mililitros de sangue humano foram pipetados delicadamente no mesmo tubo, e foi então realizada uma centrifugação a $700 \times g$ por 30 minutos à temperatura ambiente. A camada de neutrófilos (**Figura 6**) foi aspirada com o auxílio de uma pipeta "Pasteur", e as células foram lavadas três vezes com RPMI 1640 contendo 0,1% de BSA e heparina 5UI/mL, por centrifugação a $100 \times g$ durante 5 minutos, a 4°C .

Os neutrófilos isolados foram então ressuspensos em RPMI 1640, para se obter uma suspensão de 10^6 neutrófilos/mL.

Sempre que se observava contaminação com hemácias, era feita a lise destas células através de choque hipotônico. Para tanto, era adicionado ao precipitado 1 mL de água Milli-Q por 20 segundos e depois adicionava-se $330\mu\text{L}$ de NaCl 3,6%. Era então realizada nova centrifugação, o sobrenadante era desprezado, e as células novamente ressuspensas em RPMI 1640.

b) ENSAIO DE QUIMIOTAXIA DE NEUTRÓFILOS

A quimiotaxia foi medida em microcâmara de Boyden, com 48 poços, sendo seus dois compartimentos separados por uma membrana de policarbonato, com poros de $3\mu\text{m}$. Assim, $28\mu\text{L}$ das amostras (contendo as soluções) foram colocados na parte inferior da câmara e mantidos à 37°C em estufa com 5% de CO_2 durante 1 hora.

Em seguida, o filtro colocado entre os dois compartimentos da câmara foi

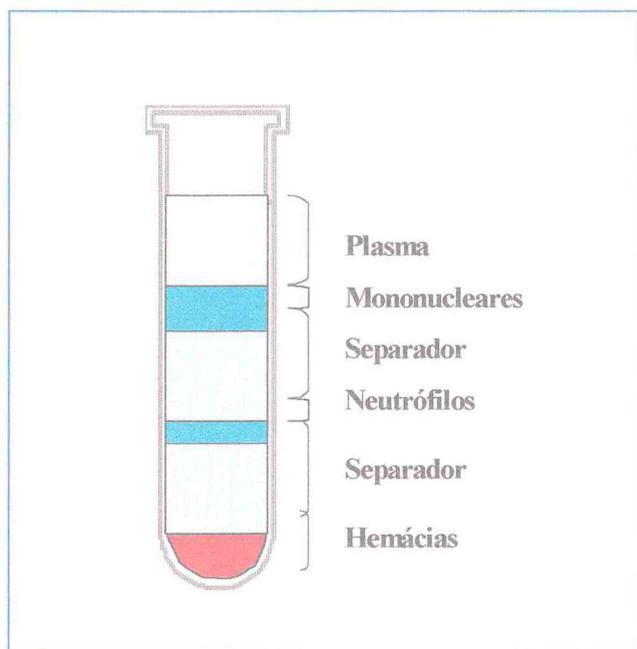


Figura 6. Isolamento de neutrófilos. 6mL de sangue humano, heparinizado, foram colocados em um tubo contendo 3mL de histopaque 1119 e 3mL contendo histopaque 1077. Seguiu-se uma centrifugação de $700 \times g$ por 30min à temperatura ambiente. A camada de neutrófilos foi aspirada, lavada com RPMI/BSA 0.1%/heparina 5UI/mL, a $100 \times g/5$ min. Repetia-se o procedimento 3 x e o precipitado final era ressuspensão em 2 mL de PBS para a contagem das células.

removido, sendo a porção superior lavada cuidadosamente com PBS, com a finalidade de retirar as células que não migraram. Os neutrófilos que migraram para a parte inferior do filtro foram fixados em metanol à 70% e corados com corante rápido HEMA 3. Estas células foram contadas, usando microscópio óptico e objetivo de imersão (aumento de 100 vezes) em cinco campos aleatórios para cada poço (6 poços para cada grupo experimental).

Para o estudo do possível efeito indutor de quimiotaxia destas proteínas *in vitro*, as lectinas PAL, BVL, AMA e HTA foram utilizadas como agentes quimiotáticos. Assim, 28 µl de RPMI 1640, fMLP (10^{-6} M), PAL (12.5, 25, 50, 100, 200 e 400µg/mL), BVL (12.5, 25, 50, 100, 200 e 400µg/mL), AMA (300 µg/mL), ou HTA (50, 100, 200, 300 e 500µg/mL), foram colocados na parte inferior da câmara. Em seguida, 50 µl da suspensão de neutrófilos (10^6 células/mL) foram adicionados à parte superior da câmara e a quimiotaxia avaliada conforme descrito no item anterior.

Em cada experimento, RPMI 1640 foi utilizado como controle negativo (migração randômica) e o fMLP, como controle positivo de migração.

4.3 – EXPERIMENTOS DE CITOMETRIA DE FLUXO

Citometria de fluxo é um dos mais seguros e específicos métodos para o estudo de eventos moleculares e morfológicos que ocorrem nas células, incluindo determinação de expressão de proteínas, detecção de antígenos intra e extracelulares, perfil da cromatina e do DNA, entre outros (Carbonari et al., 1997; Weyde et al., 1997). Como já foi dito, as lectinas possuem a propriedade de ligarem-se reversivelmente e especificamente aos carboidratos, dessa maneira, após

investigarmos os efeitos pró-inflamatórios das lectinas aqui estudadas, objetivamos identificar qualitativamente e quantitativamente, a interação das lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*, às células envolvidas nos processo de migração de neutrófilos.

4.3.1. ANÁLISE DA INTERAÇÃO DAS LECTINAS *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* E *Helianthus tuberosus* A MACRÓFAGOS/MONÓCITOS, MASTÓCITOS, E NEUTRÓFILOS, POR CITOMETRIA DE FLUXO.

A interação das lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus* com macrófagos e mastócitos de ratos, e neutrófilos e monócitos de humanos, foi avaliada por citometria de fluxo em citômetro FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company).

a) OBTENÇÃO DAS CÉLULAS:

a.1) ISOLAMENTO E CULTURA DOS MACRÓFAGOS DE RATOS:

Os macrófagos de ratos foram isolados como descrito no item 4.3.1(a.1). Em seguida, foram incubados, em uma concentração de 10^6 células /mL, em garrafas para cultura (75mL) a 37° C em estufa com 5% de CO₂, durante 1 hora para ocorrer a adesão dos macrófagos à garrafa. Ao final desse período, o sobrenadante da cultura foi descartado e as células aderidas foram lavadas com 15 mL de RPMI 1640. Essa cultura foi então mantida por mais 24h a 37°C em estufa com 5% de CO₂

em 15mL de RPMI 1640, para adesão total dos macrófagos.

Após 24 horas, os macrófagos não aderidos foram removidos da placa por três lavagens com RPMI 1640. Para recuperar os macrófagos aderidos, o meio de cultura foi descartado, e a cultura foi incubada por 1h a 4°C com 6 mL de uma solução de 5mM de EDTA e 10% de BSA diluídos em PBS sem Ca^{++} e Mg^{++} (Ramirez & Gimenez, 2002). A suspensão celular foi aspirada colocada em um tubo de falcon (15mL), centrifugada a 100 x g durante 5 minutos, ressuspensa em PBS e quantificada em câmara de Neubauer.

a.2) ISOLAMENTO DOS MASTÓCITOS DE RATOS:

Ratos adultos pesando em média 500g foram sacrificados por deslocamento cervical, e 10 mL de RPMI 1640, pH 7.4, contendo 5 UI/mL de heparina, foram injetados na cavidade peritoneal. O peritônio foi levemente massageado, e cerca de 70% do líquido injetado foi recuperado sob condições assépticas. O fluido peritoneal coletado foi centrifugado a 200 x g durante 5 minutos a 4°C, e o precipitado resultante foi ressuspensa em 1 mL de RPMI 1640. Em seguida, 1 mL da suspensão celular foi delicadamente adicionada a outro tubo contendo 3 mL de Percoll a 65% diluído em solução de Hanks. Após essa etapa foi feita uma centrifugação a 100 x g durante 15 minutos a 4°C, sendo então, descartado o sobrenadante e o precipitado com os mastócitos (**Figura 7**) sendo então ressuspensa em 5 mL de RPMI 1640, e centrifugado à 300 x g durante 5 minutos, à 4°C. Este processo foi repetido três vezes para lavagem das células e o precipitado final foi ressuspensa em 2 mL de PBS (Oliveira *et al.*, 2002, modificada). As células foram quantificadas em câmara de Neubauer e um teste de exclusão por azul de toluidina foi realizado, para tanto, as

células foram diluídas (1:5) em solução de azul de toluidina, pH 1.8, e visualizadas por microscopia óptica.

Imediatamente após a coleta e ressuspensão dos mastócitos em PBS, as amostras foram utilizadas para o experimento de citometria de fluxo.

a.3) ISOLAMENTO DOS NEUTRÓFILOS HUMANOS:

Os neutrófilos humanos foram isolados como descrito no item 4.3.1(a.2.), e ressuspensos em PBS estéril, de maneira a termos uma concentração celular de 10^6 células/mL. Logo em seguida, estas amostras celulares foram utilizadas para os ensaios de citometria de fluxo.

a.4) CULTURA DE MONÓCITOS HUMANOS (DERIVADOS DA LINHAGEM HL60):

Os monócitos com características de monócitos humanos foram obtidos a partir da linhagem celular HL60 (ATCC – American Type Culture Collection), estimulada com vitamina D, de acordo com os estudos de McCarthy e colaboradores, 1983; Polli e colaboradores 1985 e Lee e colaboradores, 1987.

Esta linhagem foi mantida a 37°C, em estufa com 5% de CO₂, em RPMI 1640 suplementados com 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino e foram repicadas a cada dois dias (Kim *et al.*, 2001).

Para a transformação em monócitos, 4×10^4 células/mL (num total de 5mL) foram colocadas em garrafas de cultura, e 5µL de uma solução 1mM de Colecalciferol (vitamina D₃) diluídos em etanol absoluto, foram adicionados à cultura. A concentração final de Colecalciferol é inferior a 0.1% do volume final da cultura

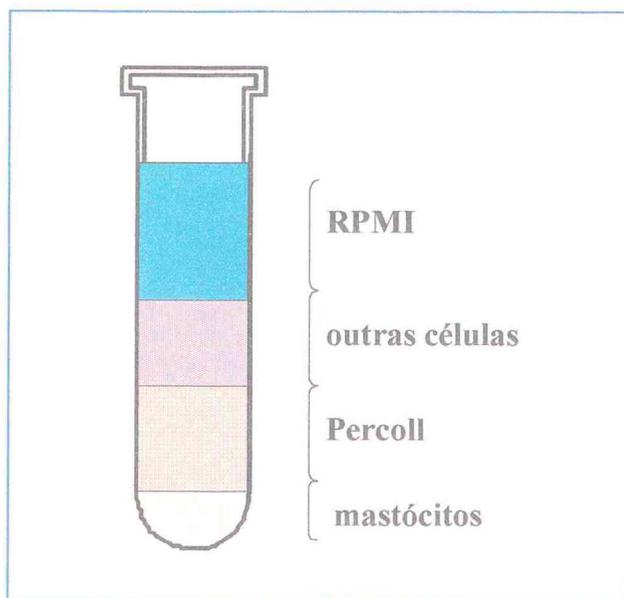


Figura 7. Isolamento de mastócitos. O fluido peritoneal foi coletado com 10 mL de RPMI 1640, centrifugado ($200 \times g/5$ min) e o precipitado ressuspense em 1 mL de meio. A suspensão celular foi adicionada a tubos contendo 3 mL de Percoll e centrifugados a $100 \times g/15$ min. O precipitado contendo os mastócitos foi ressuspense em 10 mL de RPMI 1640 e centrifugado a $200 \times g/5$ min. Repetia-se o procedimento 3 x e o precipitado final era ressuspense em 2 mL de PBS para a contagem das células.

(Allewaert *et al.*, 1995; Rao *et al.*, 2001). Após 4 dias a 37°C em estufa com 5% de CO₂, as células foram recuperadas, lavadas 2 x com PBS a 100 x g durante 5 minutos, a 4°C, quantificadas em câmara de Neubauer, e ressuspendidas em PBS.

b) MARCAÇÃO DAS LECTINAS

Alíquotas contendo 1mg das lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*, acrescidas do monossacarídeo inibidor (0.15M) (α -D-manose, lactose, α -D-manose e α -D-manose respectivamente), foram dissolvidas em 2mL de uma solução de conjugação (1,5 mL de tampão carbonato de sódio / bicarbonato de sódio 0.1M, pH 9.3, e 0,5 mL de etilenoglicol).

Após rápida agitação em vortex, 50 μ L de uma solução de FITC 10% (Fluorescein 5'-Isothiocyanate) (0,1mL da solução original de FITC dissolvidos em 0,9 mL de etilenoglicol) foram adicionados e mantidos sob agitação a 4°C durante 5h, ao abrigo da luz.

No passo seguinte, essas amostras foram aplicadas em uma colunas PD10 (Sephadex® G-25M da Pharmacia), previamente equilibradas com 100mL de água Milli-Q contendo 5% de n-butanol. A fração contendo a lectina marcada foi recuperada, e dializada contra água Milli-Q. A concentração de lectina marcada foi mensurada por densidade óptica, sendo então a amostra liofilizada e ressuspendida em PBS, em uma concentração final de 1mg de lectina marcada por 1mL de PBS. A densidade óptica foi mensurada de acordo com a equação: Absorbância real ($\lambda=280\text{nm}$) = Absorbância da lectina/FITC ($\lambda=280\text{nm}$) – 1/3 Absorbância lectina/FITC ($\lambda= 495\text{nm}$).

c) ENSAIOS DE CITOMETRIA DE FLUXO:

Para avaliação da interação das lectinas marcadas com FITC às células, 200µL de solução contendo 10^6 células (macrófagos de ratos; mastócitos de ratos; neutrófilos humano; monócitos derivados da linhagem HL60), ressuspensos em PBS, foram incubadas com 20µg das lectinas *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* ou *Helianthus Tuberosus*, marcadas com FITC ou 20µg de BSA também marcada com FITC, em 180µL de PBS/BSA 0.1%, pH 7.4. Essa incubação deu-se por 30 min a 4°C para evitar a internalização da lectina. Em seguida as células foram lavadas com PBS por centrifugação a 200 x g durante 5 minutos, a 4°C. Esta operação foi repetida 3 vezes, e finalmente as células foram ressuspensas em 400µL de PBS para serem examinadas no citômetro de fluxo. Todo o experimento foi realizado ao abrigo da luz.

A intensidade de fluorescência (verde – FL1) utilizada para FITC, foi mensurada sobre 5000 eventos para cada amostra. Em cada experimento três amostras foram avaliadas; um controle, onde foi avaliado a auto-fluorescência das células sozinhas; um controle negativo, em que às células foram incubadas com BSA marcada com FITC; e uma terceira amostra, das células incubadas com a lectina marcada com FITC. Cada experimento foi repetido no mínimo três vezes e os resultados foram expressos por média geométrica (unidades arbitrárias) da intensidade de fluorescência (FL-1), calculado pelo programa "Cell Quest Software (Becton, Dickinson and Company)". A estatística foi realizada pelo próprio programa, usando o teste Kolmogorov-Smirnoff, com valores de $p < 0.001$.

Para fazer uma comparação das afinidades das quatro lectinas às células, foram calculadas as porcentagens de aumento da intensidade de fluorescência das

células incubadas com a lectina marcada com FITC, em relação as intensidade de fluorescência emitidas pelas células controle, ou seja, a auto- fluorescência celular.

Em cada experimento, a viabilidade celular foi mensurada pela intensidade de fluorescência (vermelha - FL-2), emitida pela marcação do DNA celular. Para tanto as amostras foram incubadas por 10 minutos, com 10 μ L de uma solução de iodeto de propídio (100 μ g/mL, diluído em álcool etílico absoluto) (Placido *et al.*, 1997; Oostveldt *et al.*, 1999; Delgado *et al.*, 2001), uma vez que as células mortas permitem a entrada do corante na célula, e este fixa-se ao DNA. Os valores referentes ao numero de células vivas foram expressos por porcentagem.

A exclusão da contaminação da cultura com outro tipo celular foi realizada antes de cada experimento, por citometria de fluxo, avaliando-se o tamanho celular (FSC-H "Forward-scatter") e a granulação das células (SSC-H "Side-scatter"). Si alguma cultura apresentasse uma dupla população, o experimento era então descartado.

A determinação da concentração de lectina marcada com FITC a ser usada neste protocolo, foi feita de acordo com experimentos pilotos (dados não apresentados), usando-se várias concentrações de lectinas/FITC. A dose então escolhida, foi a dose mediana, a qual mostrou significância com as quatro lectinas estudadas. Este trabalho também foi baseado com dados de Pinto (2001), em sua tese de doutorado.

4.3.2 – AVALIAÇÃO DO AUMENTO DA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA DE MACRÓFAGOS E MASTÓCITOS PRÉ-INCUBADOS COM SOBRENADANTE DE CULTURA DE MACRÓFAGOS PRÉ-ESTIMULADOS COM AS LECTINAS.

Com o objetivo de verificar si as proteínas produzidas ou não, por macrófagos estimulados as lectina estudadas, seriam capazes de modificar a membrana celular de uma nova cultura de células (macrófagos ou mastócitos), expondo mais os sítios de ligação às lectinas, aumentando então a intensidade de fluorescência emitida, macrófagos de ratos, foram isoladas e cultivadas como descrito nos itens 4.3.1(a.1.), e o sobrenadante de cada poço foi descartado, sendo então, as células incubadas com 300µg/mL/poço das lectinas PAL, BVL, AMA, ou HTA, diluídas em RPMI 1640. Foi considerado controle, o poço que recebeu somente RPMI 1640.

As culturas permaneceram a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por 1h, e após esse período, foram lavadas e outros 1.5mL de RPMI 1640 foram adicionados, permanecendo por mais 3h, para que os macrófagos estimulados ou não liberassem seus fatores pró ou antiinflamatórios. O sobrenadante de cada poço foi recuperado.

Outras amostras de macrófagos e mastócitos de ratos, isolados como descrito nos itens 4.3.1.(a.1 e a.2), em uma concentração celular de 10⁶ células para cada "grupo" (lectina), foram incubados por 1h, a 37°C em estufa com 5% de CO₂, com 1mL do sobrenadante dos macrófagos pré-estimulados com as lectinas. Em seguida as células foram lavadas com PBS, 3 x, por centrifugação a 200 x g por 5 minutos e ressuspensas com PBS.

Seguiu-se então a incubação com as lectinas marcadas com FITC aos macrófagos e mastócitos, como descritas no item 4.3.1(c). e a intensidade de fluorescência foi mensurada.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados da investigação do efeito pró-inflamatório das lectinas de *Pisum*

arvense, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*, na indução da imigração de neutrófilos *in vivo*, foram expressos como média \pm E.P.M. de 5 animais, na maioria dos experimentos. Para os testes de quimiotaxia *in vitro*, foi feita a média \pm E.P.M., referente a 6 poços para cada grupo, onde em cada "poço", eram contados 5 grupos aleatórios. A determinação das diferenças estatísticas entre os grupos, foi realizada, utilizando-se Análise de Variância (ANOVA) e teste de Bonferroni. $p < 0,05$ foi fixado para indicar significância estatística.

Os resultados da citometria de fluxo foram expressos como média geográfica do histograma da intensidade de fluorescência (FL-1), ou como porcentagem da intensidade de fluorescência (FL-2) referente ao número de células vivas, as médias bem como as porcentagens foram calculadas pelo programa "Cell Quest Software" (Becton, Dikson and Company) onde a estatística foi calculada pelo teste Kolmogorov-Smirnoff, com valores de $p < 0.01$ como nível de significância estatística.

III- RESULTADOS

1. EFEITO DAS LECTINAS DE *Pisum arvense*, *Bauhinia vairegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus* NA INDUÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA CAVIDADE PERITONEAL DE RATOS.

As lectinas de PAL e BVL nas doses de 100, 200 e 300µg/mL, e de AMA e HTA nas doses de 80, 200 e 500µg/mL, administradas em um volume de 1mL, na cavidade peritoneal de ratos, induziram migração de neutrófilos, de maneira significativa, 4 horas após injeção i.p. (**Figuras 8, 9, 10 e 11**). Em porcentagem, vemos que nas doses citadas, estas lectinas induziram um aumento de migração de neutrófilos, respectivamente, para a lectina de *Pisum arvense* na ordem de 584, 697 e 733%, para a lectina de *Bauhinia variegata* em 278, 385, 664%, para a lectina de *Arum maculatum* em 71, 556 e 259%, e para a lectina de *Helianthus tuberosus* em 545, 724, e 878%, todas em relação ao grupo que recebeu salina.

Uma vez que a dose de 200µg/cavidade feita nos experimentos das quatro lectinas apresentou significância, e que na maioria foi a dose média, essa dose foi escolhida para os experimentos seguintes.

2. EFEITO DAS LECTINAS de *Pisum arvense*, *Bauhinia vairegata*, *Arum maculatum* E *Helianthus tuberosus*, INCUBADAS COM SEUS AÇUCARES ESPECÍFICOS, NA INDUÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL DE RATOS.

As lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia Variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*, incubadas durante 30min a 37°C, com α -D-manose, lactose, α -D-manose e α -D-manose respectivamente (0.1M), foram testadas no ensaio de

migração de neutrófilos com o intuito de investigar o envolvimento de resíduos de açúcares na atividade das lectinas.

Os resultados obtidos, nos demonstram que a incubação das lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus* com seus açúcares específicos, foram capazes de reduzir de maneira significativa (31, 43, 85 e 71%, respectivamente) a capacidade de tais lectinas induzirem migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos (**Figura 12, 13, 14 e 15**).

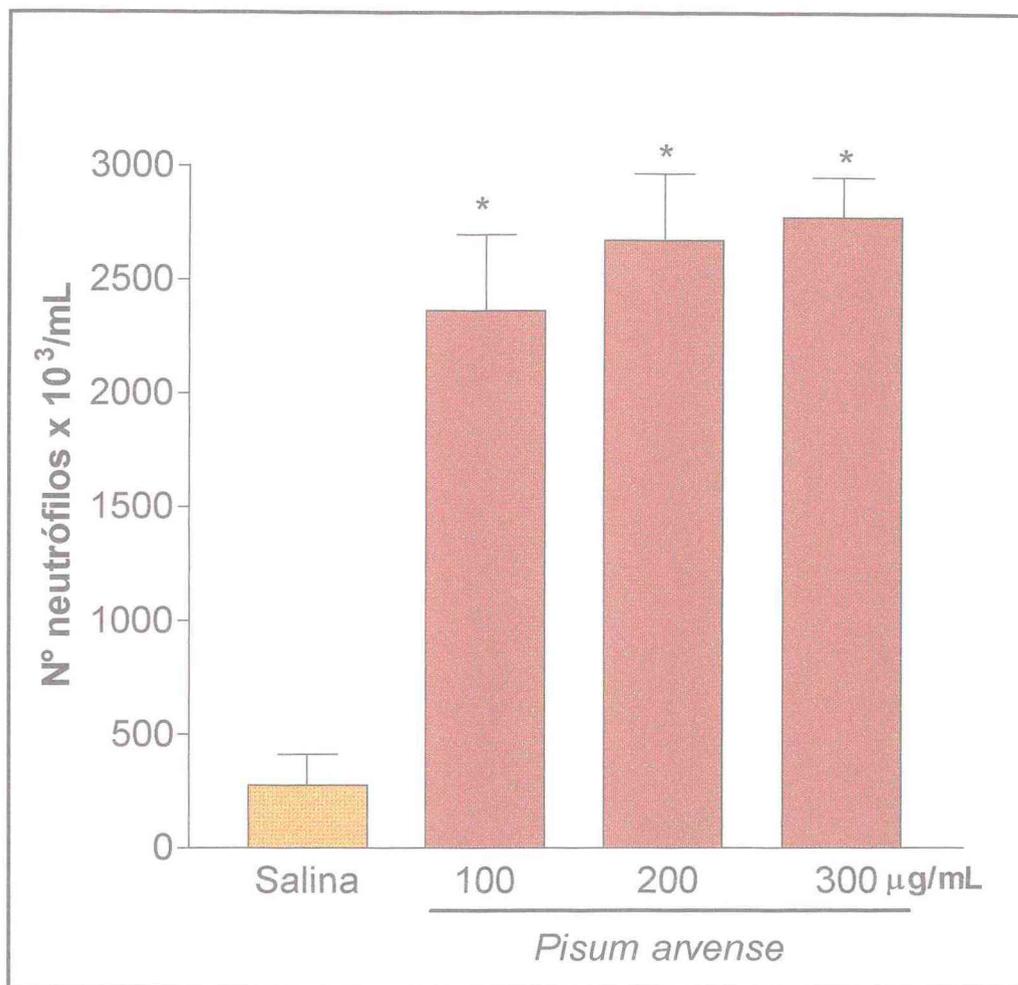


Figura 8. A lectina de *Pisum arvense* foi capaz de induzir migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos. Os animais receberam por via intraperitoneal 1 mL de PAL (100, 200 ou 300µg/mL.), ou salina (controle). A migração de neutrófilos (MN) foi avaliada 4 h após a injeção dos estímulos. Os valores estão expressos como média ± E.P.M. de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina. ANOVA- Teste de Bonferroni.

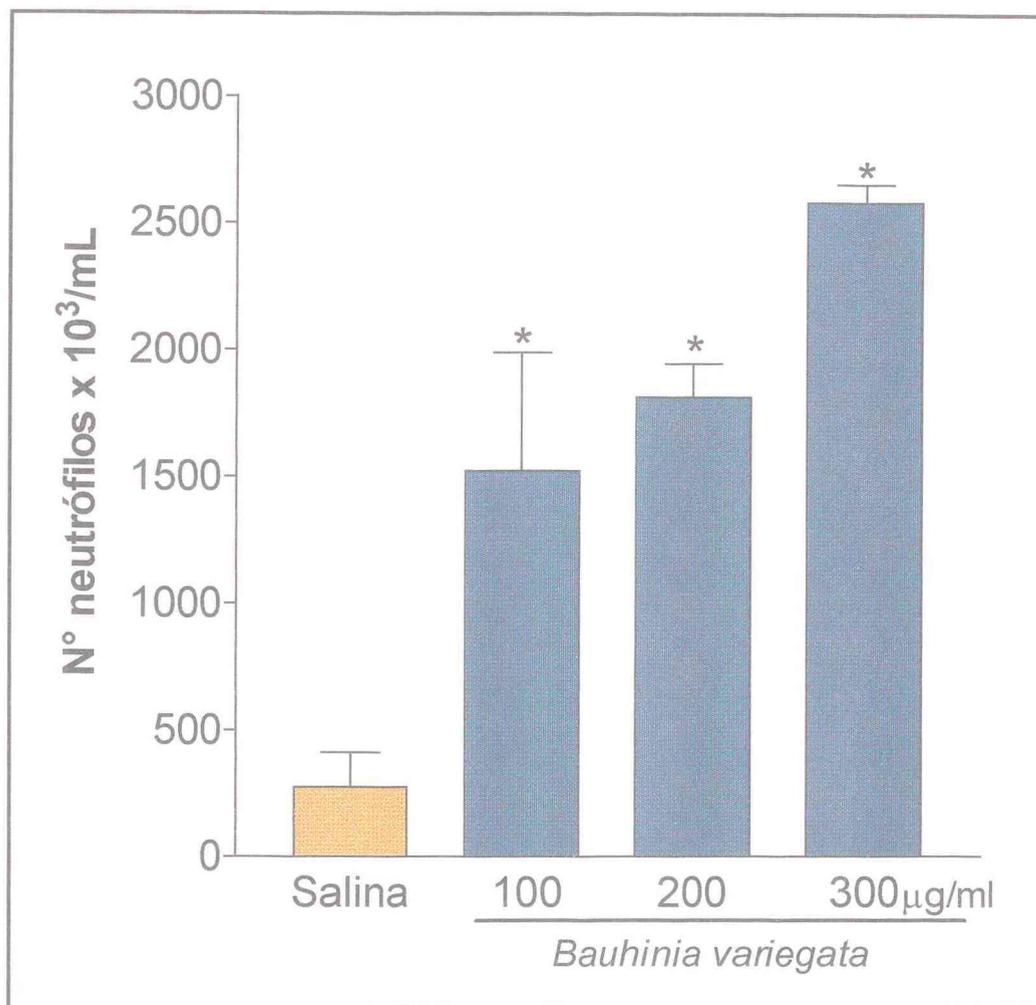


Figura 9. A lectina de *Bauhinia variegata* foi capaz de induzir migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos. Os animais receberam por via intraperitoneal 1 mL de BVL (100, 200 ou 300µg/mL.), ou salina (controle). A migração de neutrófilos (MN) foi avaliada 4 h após a injeção dos estímulos. Os valores estão expressos como média ± E.P.M. de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina. ANOVA- Teste de Bonferroni.

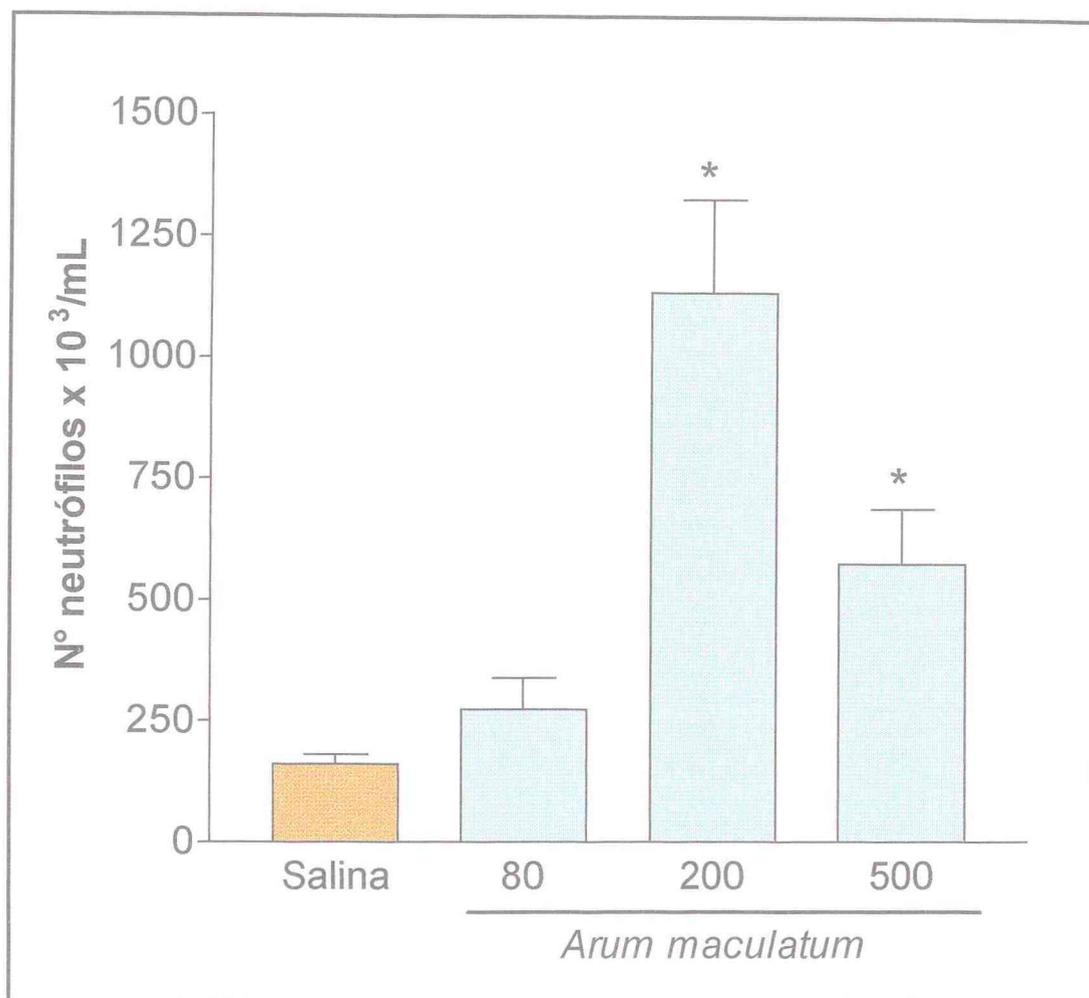


Figura 10. A lectina de *Arum maculatum* foi capaz de induzir migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos. Os animais receberam por via intraperitoneal 1 mL de AMA (80, 200 ou 500µg/mL.), ou salina (controle). A migração de neutrófilos (MN) foi avaliada 4 h após a injeção dos estímulos. Os valores estão expressos como média ± E.P.M. de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina. ANOVA- Teste de Bonferroni.

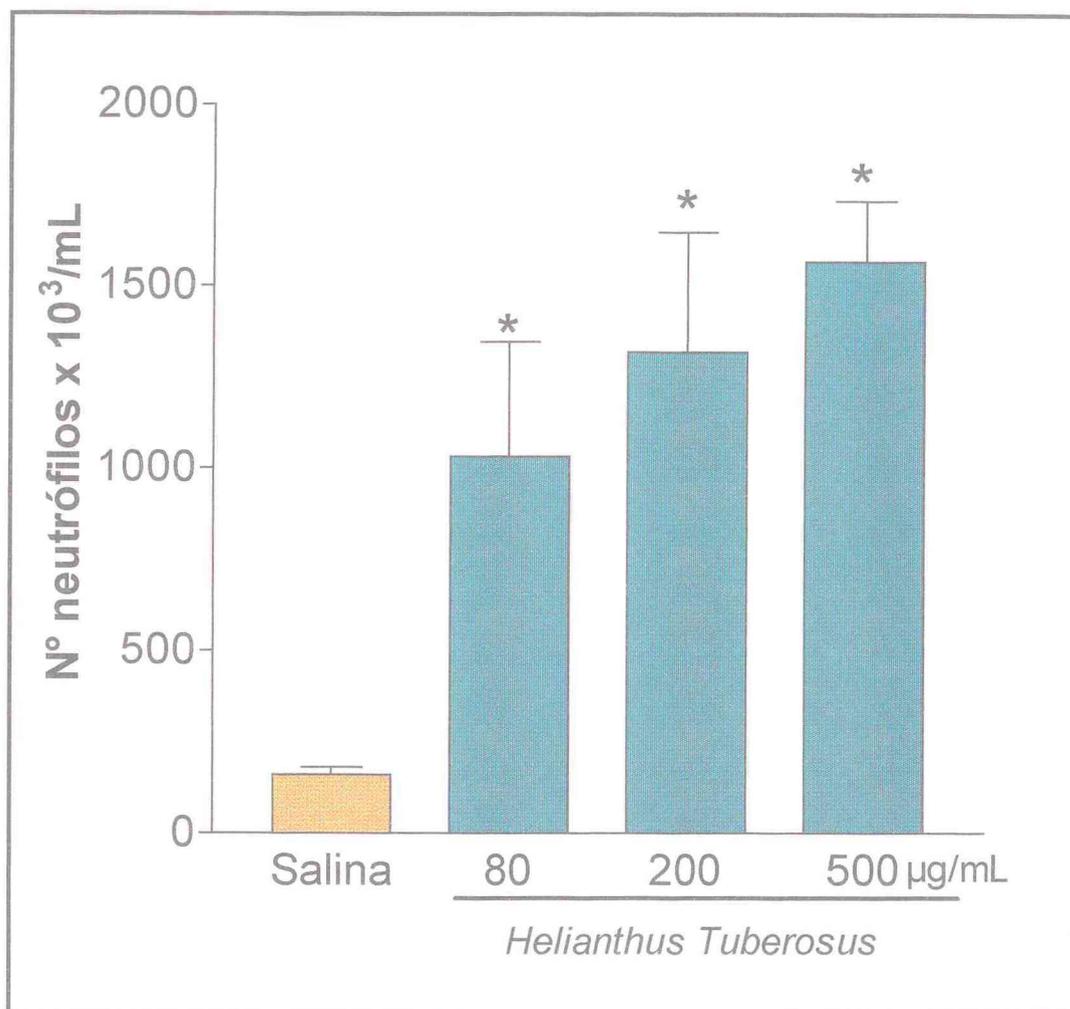


Figura 11. A lectina de *Helianthus tuberosus* foi capaz de induzir migração para a cavidade peritoneal de ratos. Os animais receberam por via intraperitoneal 1 mL de HTA (80, 200 ou 500µg/mL.), ou salina (controle). A migração de neutrófilos (MN) foi avaliada 4 h após a injeção dos estímulos. Os valores estão expressos como média ± E.P.M. de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina. ANOVA- Teste de Bonferroni.

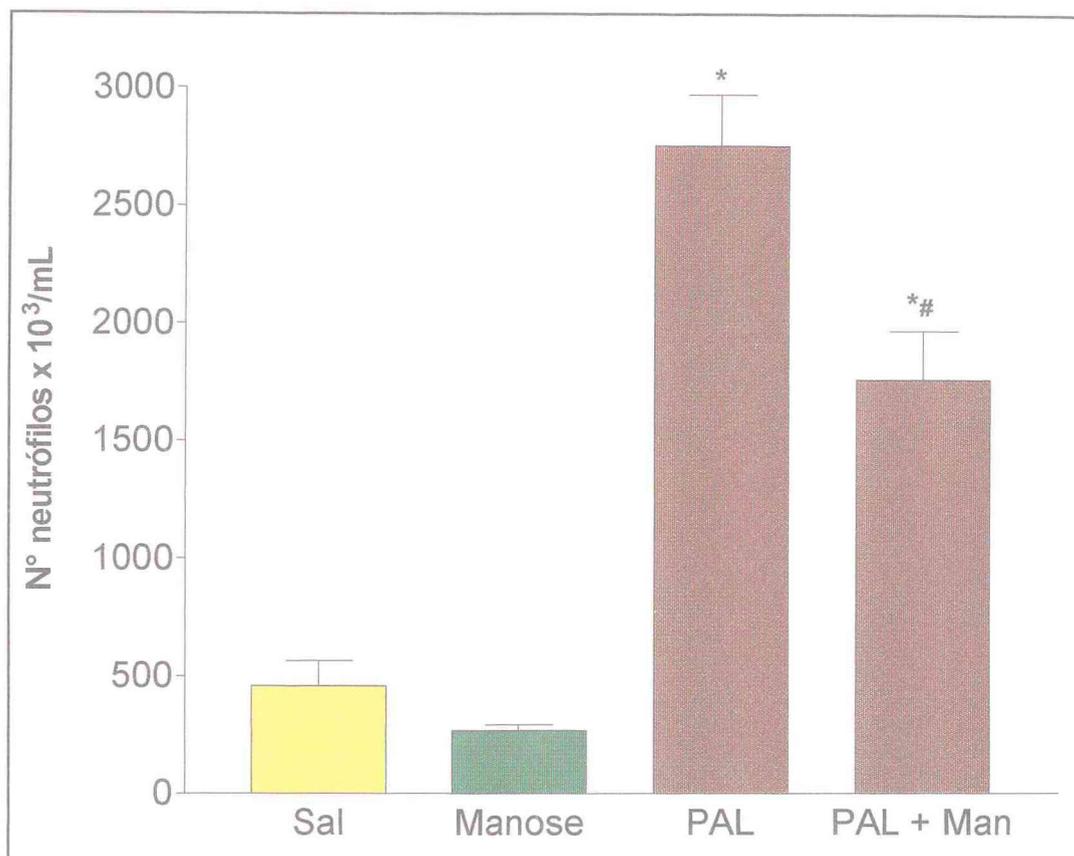


Figura 12. A incubação da lectina de *Pisum arvense* com seu açúcar específico, foi capaz de reduzir a migração de neutrófilos induzida pela lectina sozinha. Previamente ao ensaio de migração, PAL(200µg/mL) foi incubada com α -D-manose (0.1M), a 37°C por 30min. Os animais receberam por via intraperitoneal 1 ml de salina (Sal); α -D-manose (0.1M); PAL (200µg/mL) e PAL (200µg/mL) incubada com α -D-manose (0.1M). A migração de neutrófilos foi avaliada 4h após, e os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado à Sal, e # $p < 0,05$, comparado à PAL. ANOVA- Teste de Bonferroni.

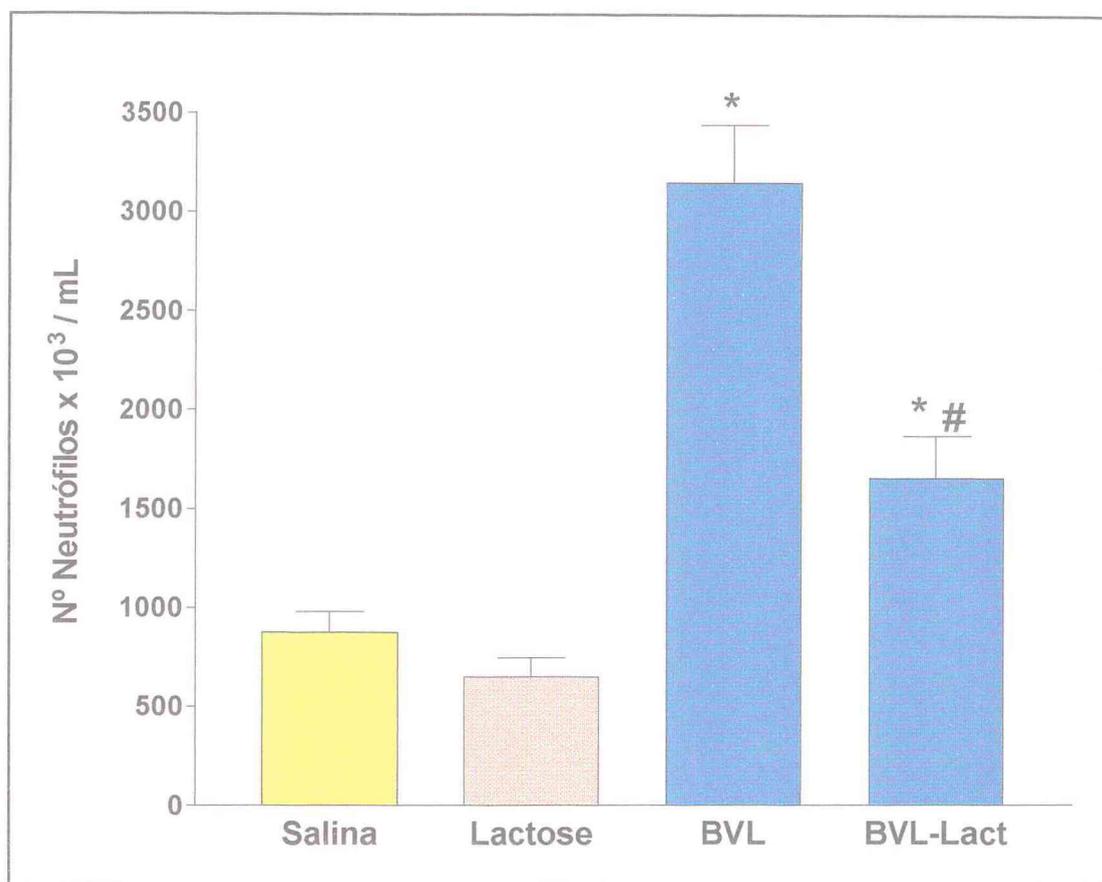


Figura 13. A incubação da lectina de *Bauhinia variegata* com seu açúcar específico, foi capaz de reduzir a migração de neutrófilos induzida pela lectina sozinha. Previamente ao ensaio de migração, BVL(200µg/mL) foi incubada com Lactose (0.1M), a 37°C por 30min. Os animais receberam por via intraperitoneal 1 mL de salina (Sal); Lactose (0.1M); BVL (200µg/mL) e BVL (200µg/mL) incubada com lactose (0.1M). A migração de neutrófilos foi avaliada 4h após, e os resultados foram expressos como média ± E.P.M. de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado a Sal e # $p < 0.05$, comparado à BVL. ANOVA- Teste de Bonferroni.

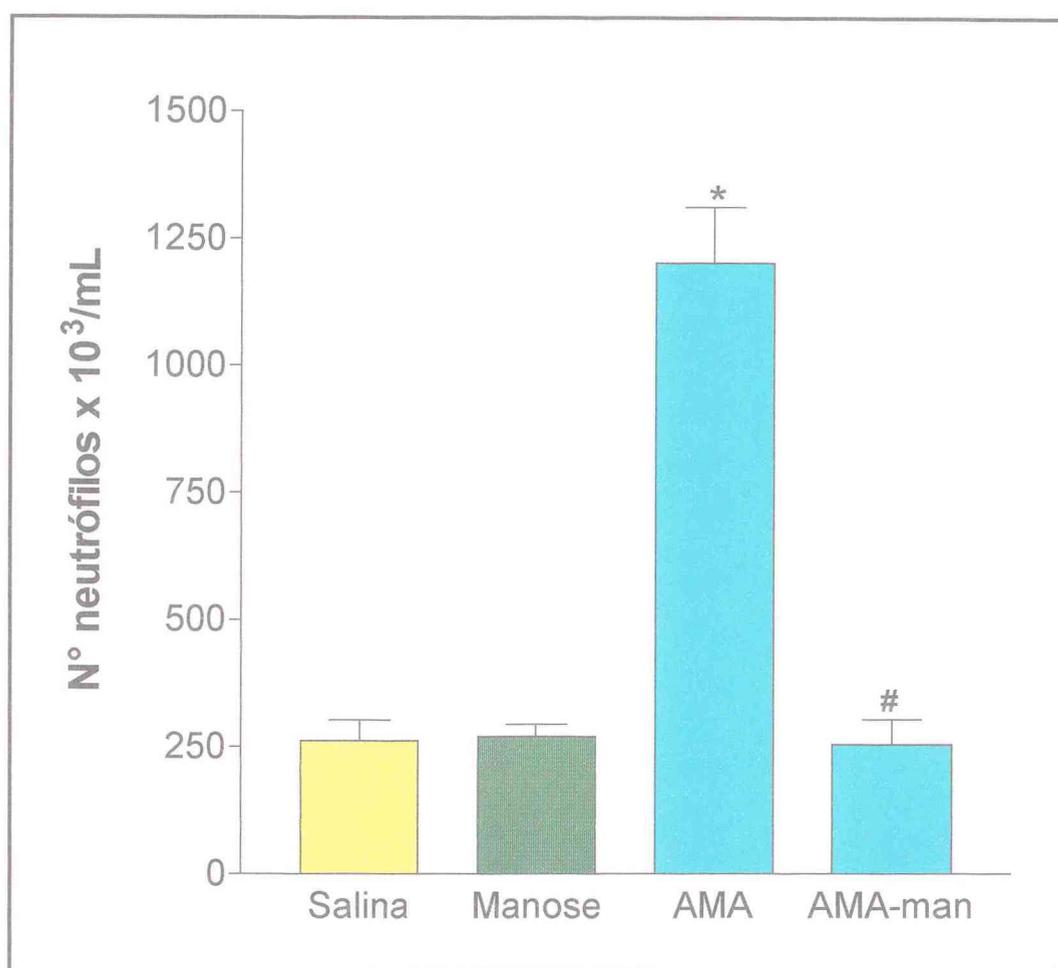


Figura 14. A incubação da lectina *Arum maculatum* com seu açúcar específico, foi capaz de inibir a migração de neutrófilos induzida pela lectina sozinha. Previamente ao ensaio de migração, AMA(200µg/mL) foi incubada com α -D-manose (0.1M), a 37°C por 30min. Os animais receberam por via intraperitoneal 1 mL de salina (Sal); α -D-manose (0.1M); AMA (200µg/mL) e AMA (200µg/mL) incubada com α -D-manose (0.1M). A migração de neutrófilos foi avaliada 4h após, e os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado a Sal, e # $p < 0.05$, comparado à AMA. ANOVA- Teste de Bonferroni.

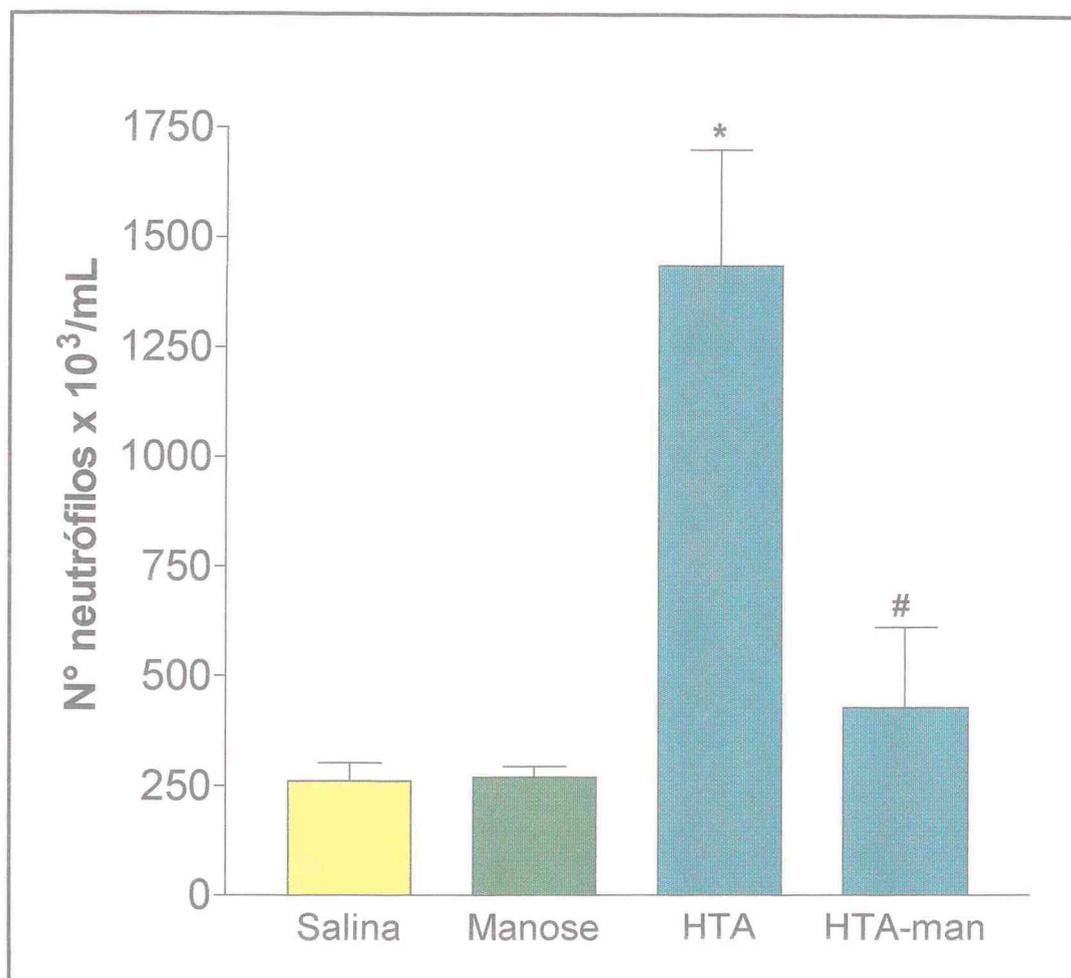


Figura 15. A incubação da lectina de *Helianthus tuberosus* com seu açúcar específico, foi capaz de inibir a migração de neutrófilos induzida pela lectina sozinha. Previamente ao ensaio de migração, HTA(200µg/mL) foi incubada com α -D-manose (0.1M), a 37°C por 30min. Os animais receberam por via intraperitoneal 1 mL de salina (Sal); α -D-manose (0.1M); HTA (200µg/mL) e HTA (200µg/mL) incubada com α -D-manose (0.1M). A migração de neutrófilos foi avaliada 4h após, e os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado a Sal, e # $p < 0,05$, comparado à HTA. ANOVA- Teste de Bonferroni.

3. PAPEL DAS CÉLULAS RESIDENTES NA INDUÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA CAVIDADE PERITONEAL DE RATOS, PELAS LECTINAS DE *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* E *Helianthus tuberosus*.

3.1. EFEITO DAS LECTINAS PAL, BVL, AMA E HTA APÓS A DEPLEÇÃO DA POPULAÇÃO DAS CÉLULAS RESIDENTES, PELA LAVAGEM DA CAVIDADE PERITONEAL DOS RATOS.

Após a lavagem da cavidade peritoneal dos ratos, obtivemos uma redução de 81% (no mínimo) do número de células residentes das cavidades lavadas (L), comparadas com as cavidades falso-lavadas (FL), em cada experimento (**Figuras 16 A, 17 A, 18 A e 19 A**). A depleção das células residentes da cavidade peritoneal, não foi capaz de reduzir a migração de neutrófilos induzida por PAL (200µg/mL) (**Figura 16 B**). De maneira similar à lectina de *Pisum arvense*, os procedimentos de lavagem não foram capazes de reduzir, de maneira significativa, a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzidas por AMA (200µg/mL) ou HTA (200µg/mL) (**Figuras 18 B, e 19 B**). Por outro lado, o procedimento de lavagem reduziu significativamente, a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, induzida por BVL (200µg/mL), uma redução de 66% (**Figura 17 B**).

3.2. EFEITO DO AUMENTO DA POPULAÇÃO MACRÓFAGOS DA CAVIDADE PERITONEAL DOS RATOS, PELO PRÉ-TRATAMENTO COM TIOGLICOLATO 3%, NA INDUÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS ESTIMULADA PELAS LECTINAS DE *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*.

O pré-tratamento com tioglicolato (Tg; 3% m/v; i.p.), 4 dias antes do ensaio da atividade das lectinas, aumentou em cerca de 100% o número de macrófagos presentes nas cavidades peritoneais dos animais, comparados aos grupos não tratados com Tioglicolato (--) (**Figuras 20A, 21A, 22A e 23A**).

O aumento do número de macrófagos residentes nas cavidades peritoneais dos ratos, pelo tratamento com tioglicolato à 3%, potencializou a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal desses animais, de maneira significativa, nos grupos estimulados pelas lectinas de *Pisum arvense* (200µg/mL), *Bauhinia variegata* (200µg/mL) e *Arum maculatum* (200µg/mL), mas não interferiu na resposta induzida pela lectina de *Helianthus tuberosus* (200µg/mL) (**Figuras 20B, 21B, e 22B e 23B**).

3.3. EFEITO DA INJEÇÃO DO SOBRENADANTE DE CULTURAS DE MACRÓFAGOS DE RATOS, ESTIMULADAS COM AS LECTINAS DE *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* E *Helianthus tuberosus*, NA INDUÇÃO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL DE RATOS.

Com o objetivo de avaliar o papel de macrófagos no efeito indutor de migração de neutrófilos das lectinas, macrófagos em cultura foram estimulados com 300µg/mL/poço das lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus* e 1mL dos sobrenadantes dessas culturas foram injetados nas cavidades peritoneais dos ratos.

Os resultados nos mostram que a injeção dos sobrenadantes das culturas de macrófagos estimulados com as lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, e

Arum maculatum, na cavidade peritoneal dos ratos, foi capaz de induzir migração de neutrófilos, de maneira semelhante à LPS (10µg/mL/poço) (**Figura 24, 25 e 26**).

Entretanto corroborando com os dados anteriores, a injeção do sobrenadante da cultura de macrófago estimulada com a lectina de *Helianthus tuberosus* não foi capaz de induzir migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos ratos (**Figura 27**).

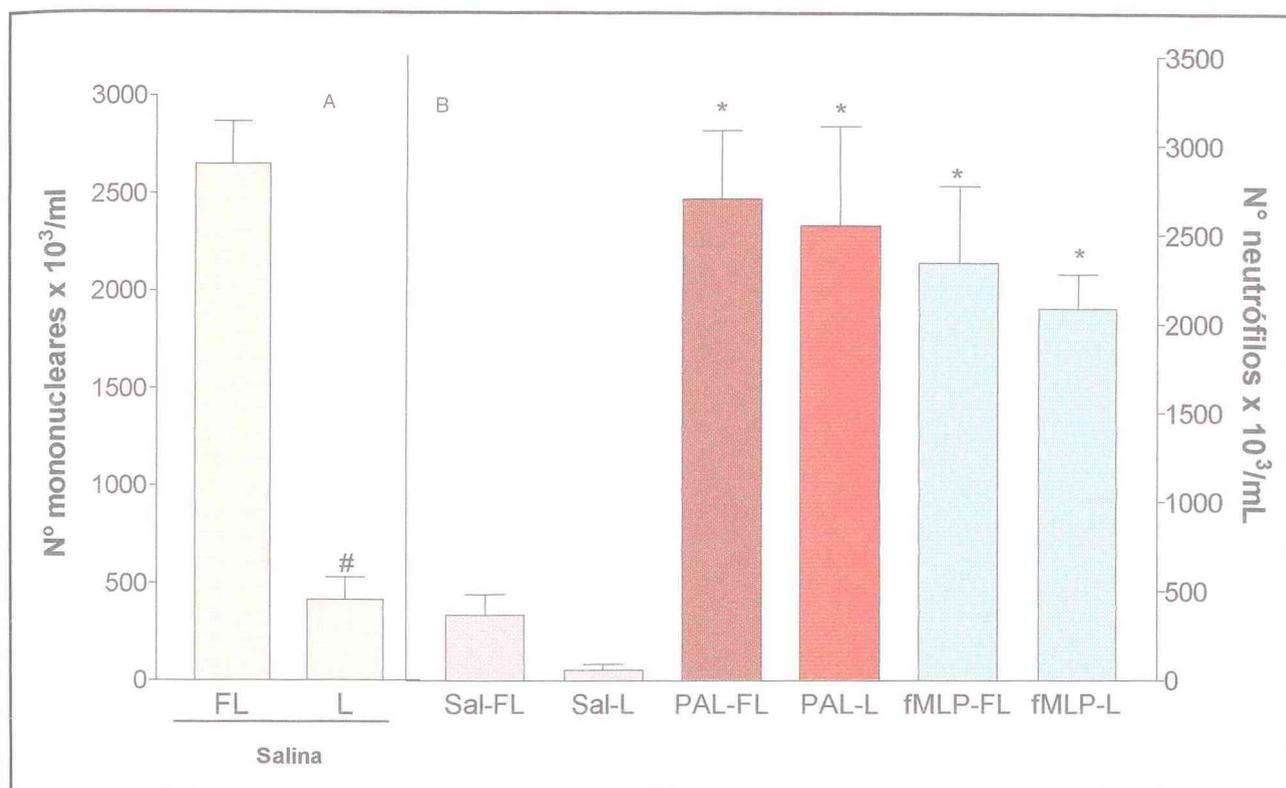


Figura 16. A redução da população de células residentes, pela lavagem da cavidade peritoneal, não inibiu a migração de neutrófilos induzida por PAL. **Painel A:** n° de células residentes totais nas cavidades falso-lavadas (FL) e lavadas (L). **Painel B:** mostra a migração de neutrófilos (MN) induzida por salina (Sal; 1 mL), PAL (200µg/mL.) e fMLP (10×10^{-10} moles/cav.) nas cavidades falso-lavadas (FL) ou lavadas (L). A MN foi avaliada 4 h após a injeção i.p. dos estímulos. Resultados expressos como média \pm E.P.M. de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado salina; # $p < 0,05$ comparado ao controle falso-lavado de cada grupo. ANOVA- Teste de Bonferroni.

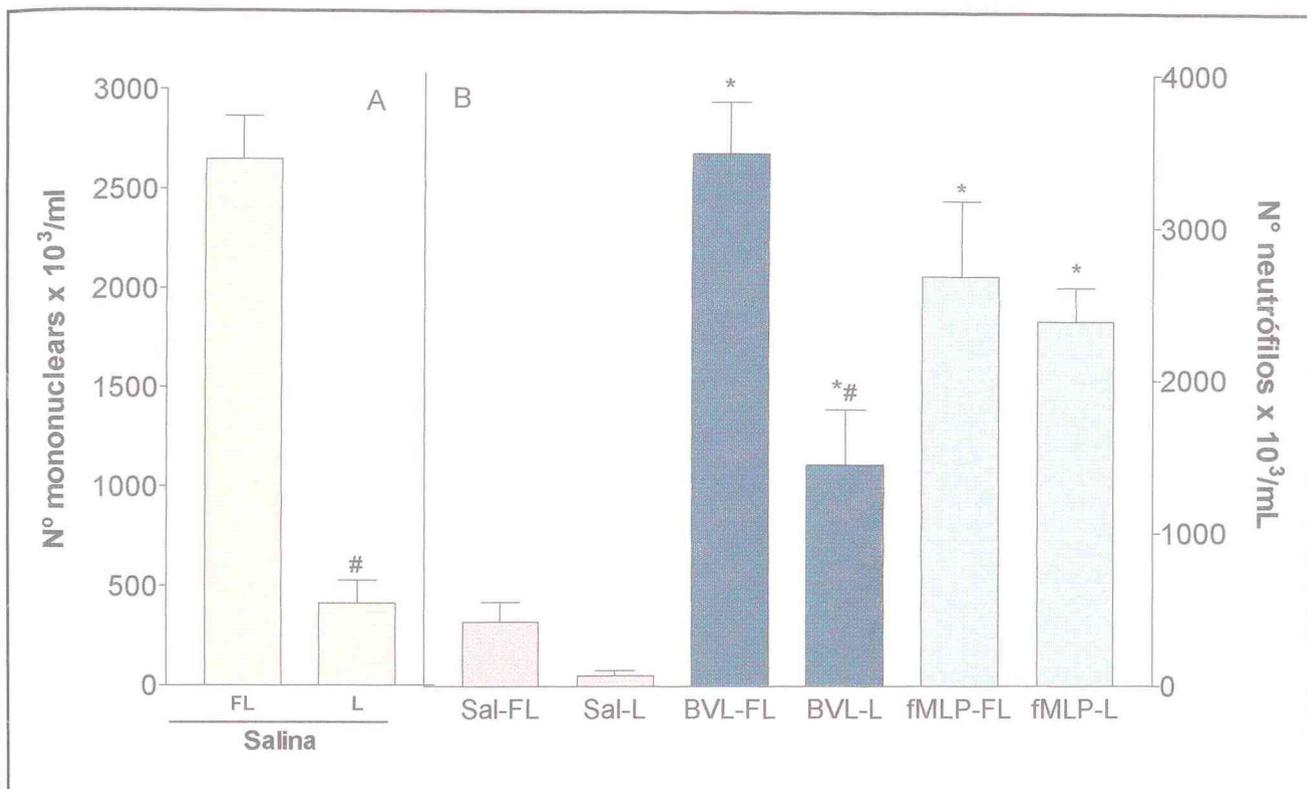


Figura 17. A redução da população de células residentes, pela lavagem da cavidade peritoneal, reduziu a migração de neutrófilos induzida por BVL. **Painel A:** n° de células residentes totais nas cavidades falso-lavadas (FL) e lavadas (L). **Painel B:** mostra a migração de neutrófilos (MN) induzida por salina (Sal; 1 mL), BVL (200µg/mL) e fMLP (10 x 10⁻¹⁰ moles/cav.) nas cavidades falso-lavadas (FL) ou lavadas (L). A MN foi avaliada 4 h após a injeção i.p. dos estímulos. Resultados expressos como média ± E.P.M. de 5 animais. **p* < 0,05 comparado salina; #*p* < 0,05 comparado ao controle falso-lavado de cada grupo. ANOVA- Teste de Bonferroni.

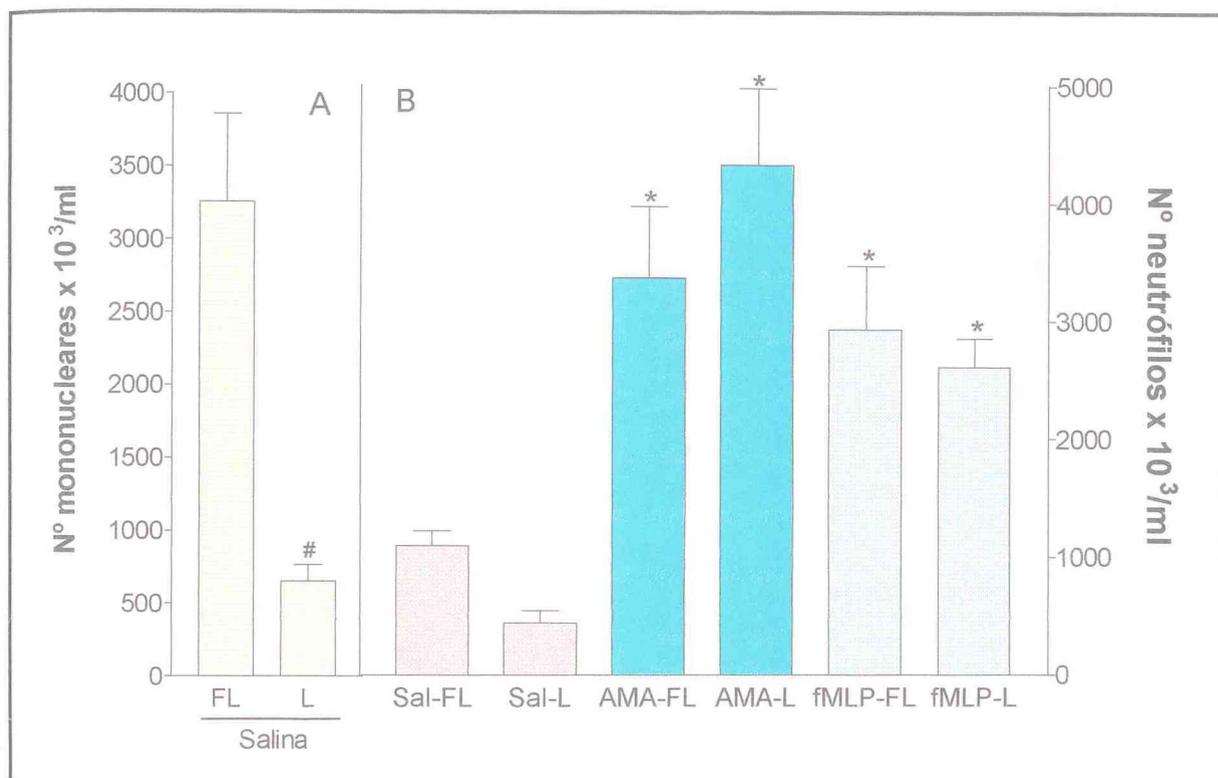


Figura 18. A redução da população de células residentes, pela lavagem da cavidade peritoneal, não inibiu a migração de neutrófilos induzida por AMA. Painel A: n° de células residentes totais nas cavidades falso-lavadas (FL) e lavadas (L). **Painel B:** mostra a migração de neutrófilos (MN) induzida por salina (Sal; 1 mL), AMA (200µg/mL.), fMLP (10×10^{-10} moles/cav.) nas cavidades falso-lavadas (FL) ou lavadas (L). A MN foi avaliada 4 h após a injeção i.p. dos estímulos. Resultados expressos como média \pm E.P.M. de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado salina; # $p < 0,05$ comparado ao controle falso-lavado de cada grupo. ANOVA- Teste de Bonferroni.

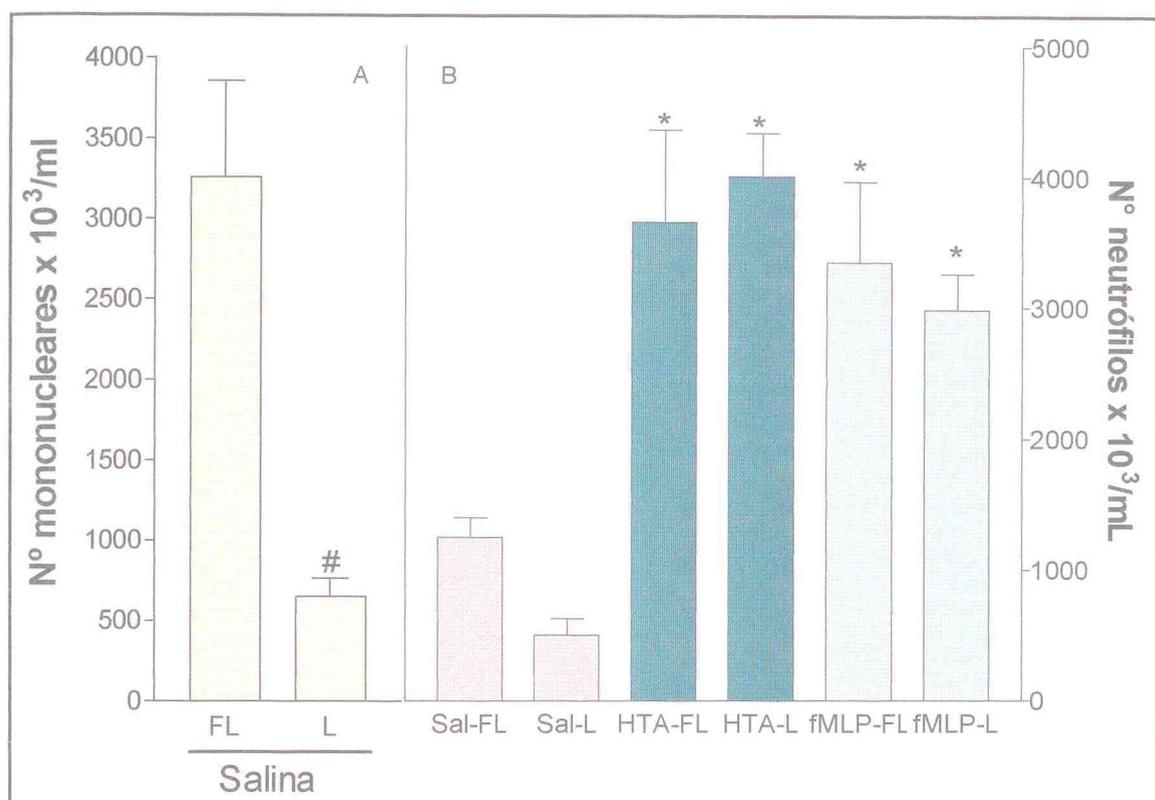


Figura 19. A redução da população de células residentes, pela lavagem da cavidade peritoneal, não inibiu a migração de neutrófilos induzida por HTA. **Painel A:** n^o de células residentes totais nas cavidades falso-lavadas (FL) e lavadas (L). **Painel B:** mostra a migração de neutrófilos (MN) induzida por salina (Sal; 1 mL), HTA (200µg/mL.), fMLP (10 x 10⁻¹⁰ moles/cav.) nas cavidades falso-lavadas (FL) ou lavadas (L). A MN foi avaliada 4 h após a injeção i.p. dos estímulos. Resultados expressos como média ± E.P.M. de 5 animais. **p* < 0,05 comparado salina; #*p* < 0,05 comparado ao controle falso-lavado de cada grupo. ANOVA- Teste de Bonferroni.

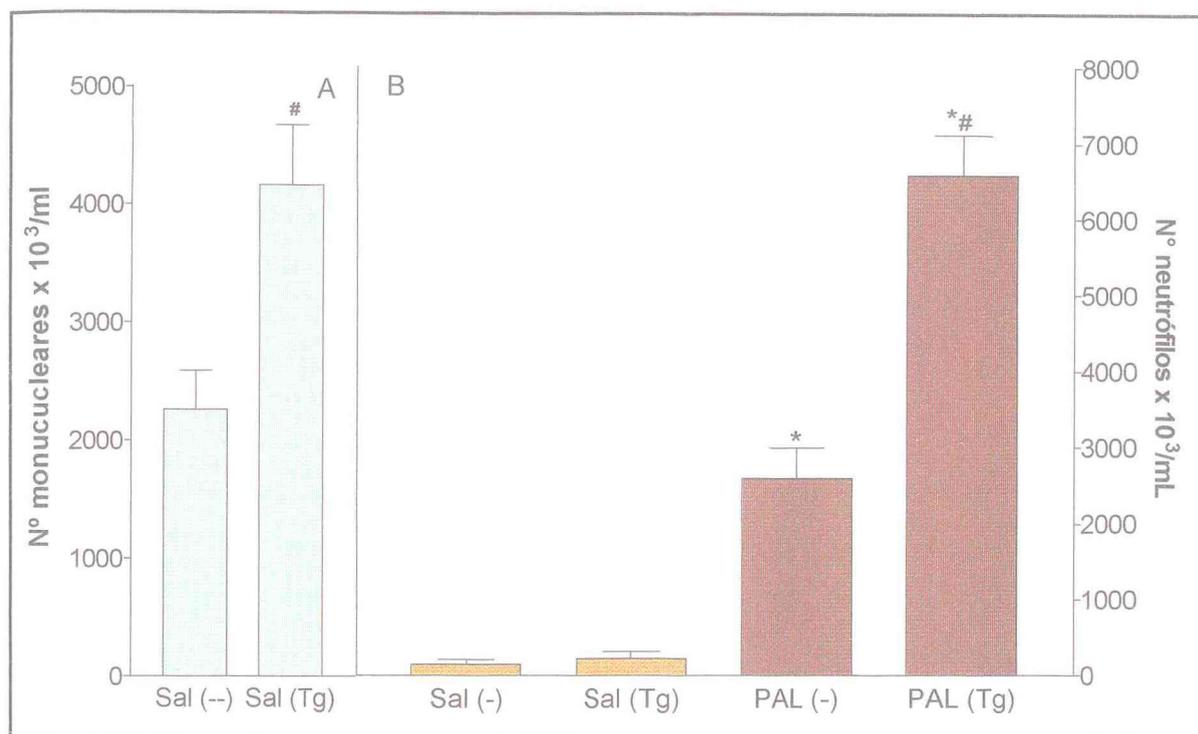


Figura 20. O pré-tratamento com tioglicolato potencia a migração de neutrófilos induzida por PAL. **Painel A:** n^o de macrófagos do grupo controle (--) e tratado com tioglicolato (Tg) 3% m/v, 10 mL (i.p.). **Painel B:** migração de neutrófilos (MN) induzida por salina (Sal, 1 mL) ou por PAL (200µg/mL) nas cavidades controle (-) ou tratadas com Tg. A MN foi avaliada 4 h após a injeção dos estímulos. Resultados expressos como média ± E.P.M. de 5 animais. **p* < 0,05 comparado a Salina; #*p* < 0,05 comparado ao controle não tratado com Tg (-). ANOVA- Teste de Bonferroni.

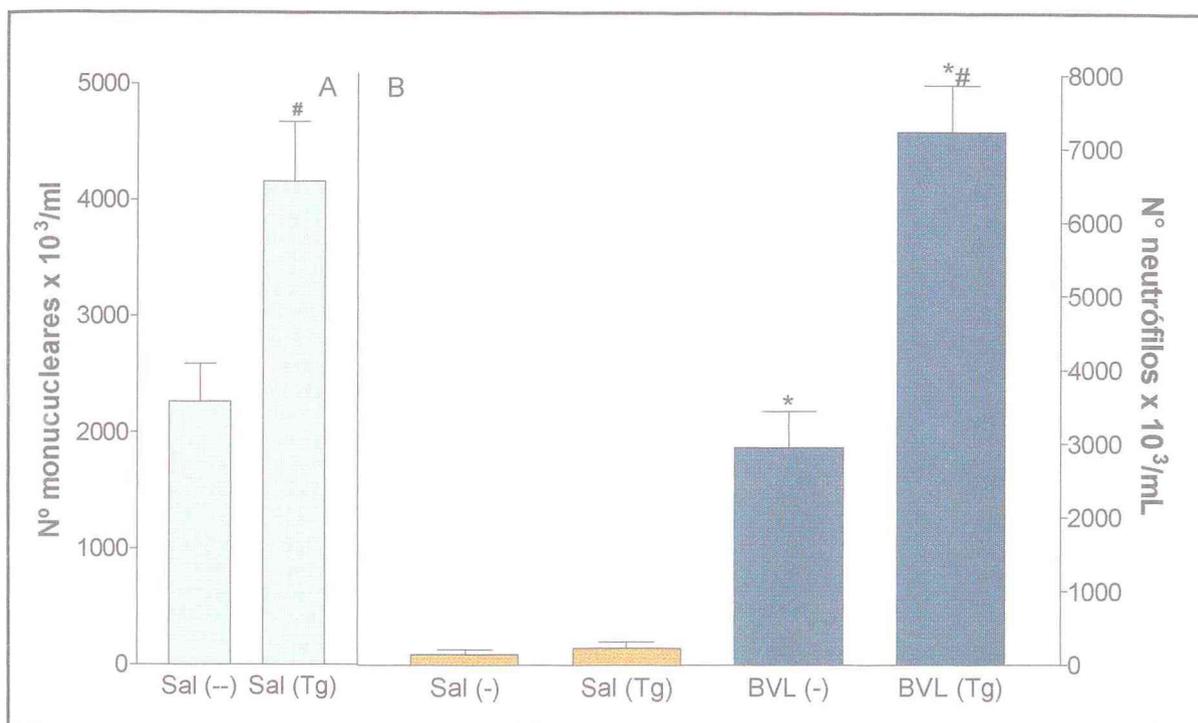


Figura 21. O pré-tratamento com tioglicolato potencia a migração de neutrófilos induzida por BVL. Painel A: n^o de macrófagos do grupo controle (-) e tratado com tioglicolato (Tg) 3% m/v, 10 mL (i.p.). **Painel B:** migração de neutrófilos (MN) induzida por salina (Sal, 1 mL) ou por BVL (200µg/mL) nas cavidades controle (-) ou tratadas com Tg. A MN foi avaliada 4 h após a injeção dos estímulos. Resultados expressos como média ± E.P.M. de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado a Salina; # $p < 0,05$ comparado ao controle não tratado com Tg (-). ANOVA- Teste de Bonferroni.

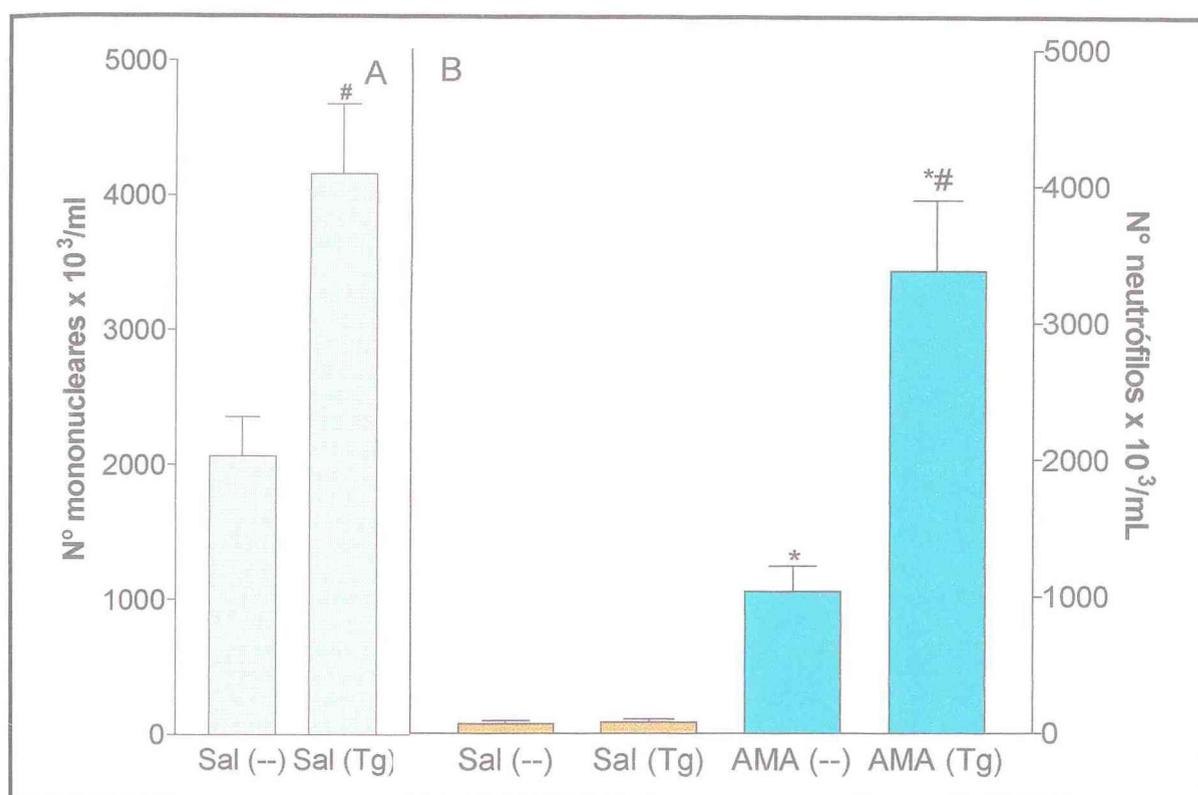


Figura 22. O pré-tratamento com tioglicolato potencia a migração de neutrófilos induzida por AMA. Painel A: n^o de macrófagos do grupo controle (--) e tratado com tioglicolato (Tg) 3% m/v, 10 mL (i.p.). **Painel B:** migração de neutrófilos (MN) induzida por salina (Sal, 1 mL) ou por AMA (200µg/mL) nas cavidades controle (-) ou tratadas com Tg. A MN foi avaliada 4 h após a injeção dos estímulos. Resultados expressos como média ± E.P.M. de 5 animais. **p* < 0,05 comparado a Salina; #*p* < 0,05 comparado ao controle não tratado com Tg (-). ANOVA- Teste de Bonferroni.

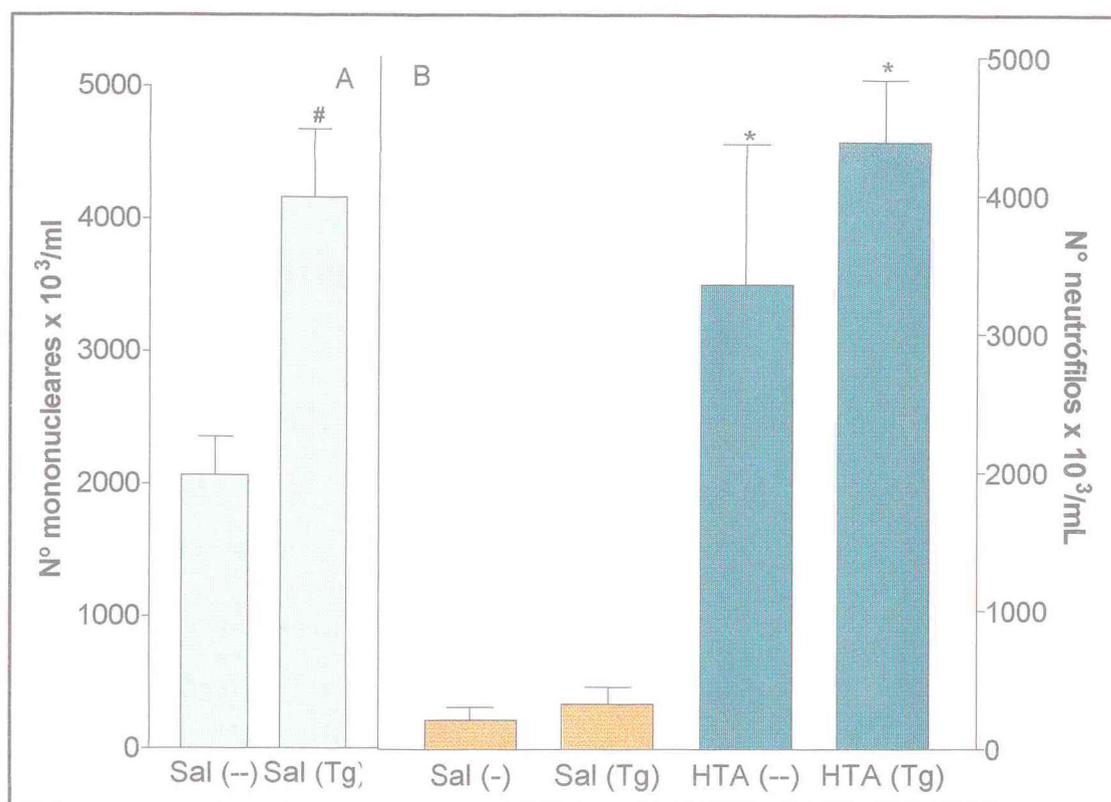


Figura 23. O pré-tratamento com tioglicolato não potencia de maneira significativa a migração de neutrófilos induzida por HTA. **Painel A:** n^o de macrófagos do grupo controle (-) e tratado com tioglicolato (Tg) 3% m/v, 10 mL (i.p.). **Painel B:** migração de neutrófilos (MN) induzida por salina (Sal, 1 mL) ou por HTA (200µg/mL) nas cavidades controle (-) ou tratadas com Tg. A MN foi avaliada 4 h após a injeção dos estímulos. Resultados expressos como média ± E.P.M. de 5 animais. **p* < 0,05 comparado a Salina; #*p* < 0,05 comparado ao controle não tratado com Tg (-). ANOVA- Teste de Bonferroni.

3.4. EFEITO DA DEPLEÇÃO DE MASTÓCITOS DA CAVIDADE PERITONEAL DE RATOS PELO COMPOSTO 48/80, NA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS INDUZIDA PELA LECTINA DE *Pisum arvense*, *Bauhinia Variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*.

O pré-tratamento com o composto 48/80 durante os 4 dias que antecederam o ensaio de migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos, reduziu a população de mastócitos peritoneais em 92% quando comparados aos grupos não tratados (**Figuras 28A, 29A, 30A e 31A**).

Na **figura 28** vemos que o pré-tratamento com o composto 48/80 potencializou a migração de neutrófilos induzida pela lectina de *Pisum arvense* (200µg/mL) de maneira significativa, quando comparado ao grupo estimulado com a mesma lectina, mas que não tratado pelo composto 48/80. Similarmente, a migração de neutrófilos induzida pelas lectinas de *Bauhinia variegata* (200µg/mL) e *Helianthus tuberosus* (200µg/mL) foi potencializada (**Figuras 29 e 31**). No entanto, o efeito da lectina de *Arum maculatum* (200µg/mL) na indução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos ratos, sob as mesmas condições, não foi alterada pelo pré-tratamento com o composto 48/80 (**Figura 30**).

4. ESTUDO DA MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS *IN VITRO* INDUZIDA PELAS LECTINAS DE *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*.

No estudo de quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*, realizado em câmara de Boyden com 48 poços, nos mostrou que a lectina de *Pisum arvense* foi capaz de

induzir a quimiotaxia dos neutrófilos de maneira significativa em todas as concentrações testadas, ou seja, 12.5, 25, 50, 100 200 e 400µg/mL (**Figura 32**) e que um platô de resposta é atingido após a dose de 50µg/mL.

A lectina de *Bauhinia variegata* também induziu quimiotaxia de neutrófilos significativamente, de maneira dose dependente, nas concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400µg/mL, mas não foi significativa na concentração de 12.5µg/mL. Observamos também que as doses de 200 e 400 mostraram uma redução na quimiotaxia comparada com as concentrações de 25, 50 e 100µg/mL (**Figura 33**). Embora a lectina *Arum maculatum* tenha sido testada apenas na concentração de 300µg/mL, ela mostrou-se capaz de induzir quimiotaxia de neutrófilos (**Figura 34**). E finalmente, na **figura 35**, vemos que a lectina de *Helianthus tuberosus* induziu quimiotaxia em todas as concentrações estudadas (50, 100, 200, 300 e 400µg/mL), mostrando um leve perfil de dose resposta.

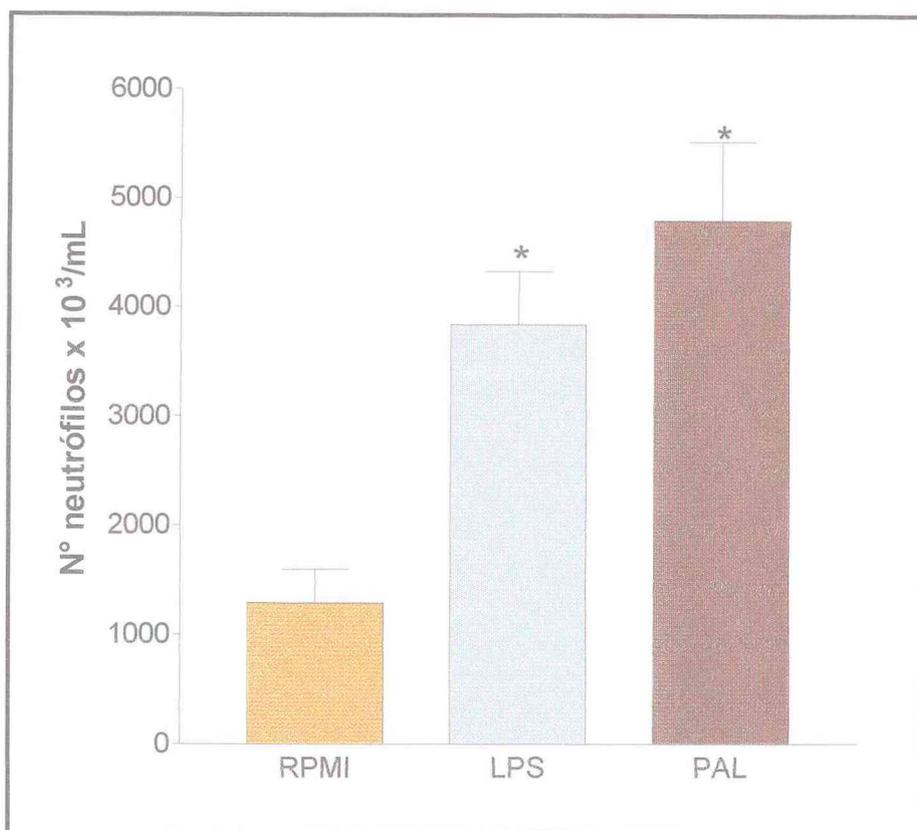


Figura 24. O sobrenadante de macrófagos em cultura estimulados com PAL apresenta atividade quimiotática para neutrófilos. Macrófagos (10^6 cells) em cultura foram estimulados ou não com PAL ($300\mu\text{g}/\text{mL}/\text{poço}$) durante 60 min ou com LPS ($10\mu\text{g}/\text{mL}/\text{poço}$). O poço controle recebeu apenas 1 mL de RPMI. O sobrenadante obtido foi administrado (1 mL/ i.p.) em animais normais e a avaliação da migração de neutrófilos foi mensurada 4 h após. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado ao grupo de macrófagos não estimulados (RPMI). ANOVA- Teste de Bonferroni.

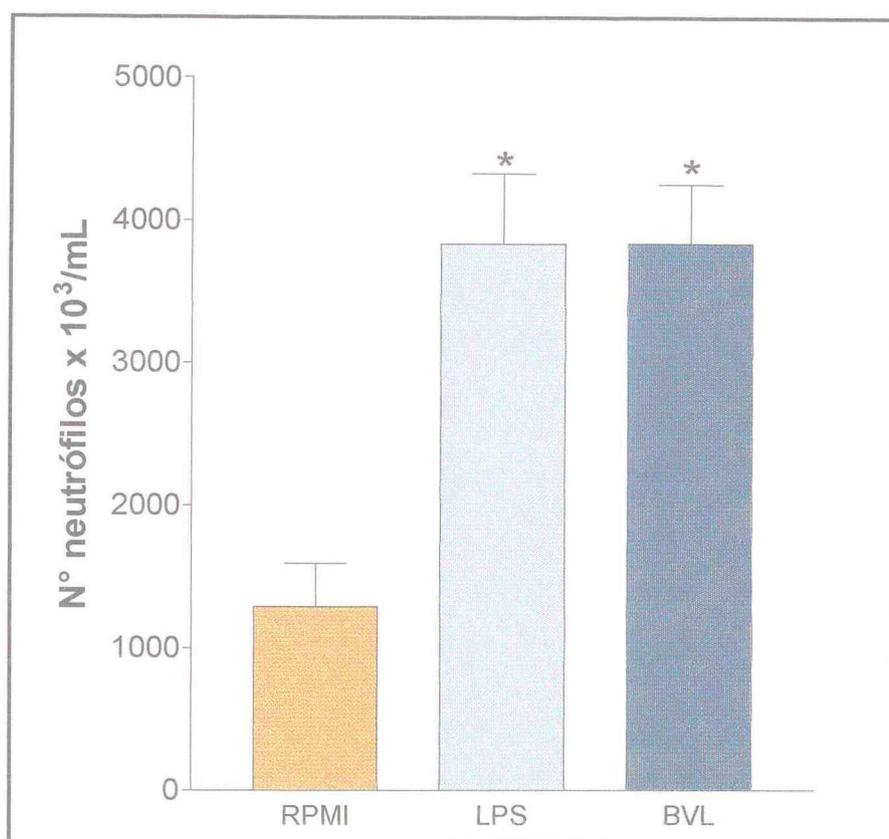


Figura 25. O sobrenadante de macrófagos em cultura estimulados com BVL apresenta atividade quimiotática para neutrófilos. Macrófagos (10^6 cells) em cultura foram estimulados ou não com BVL ($300\mu\text{g}/\text{mL}/\text{poço}$) durante 60 min ou com LPS ($10\mu\text{g}/\text{mL}/\text{poço}$). O poço controle recebeu apenas 1 mL de RPMI. O sobrenadante obtido foi administrado (1 mL/ i.p.) em animais normais e a avaliação da migração de neutrófilos foi mensurada 4 h após. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado ao grupo de macrófagos não estimulados (RPMI). ANOVA- Teste de Bonferroni.

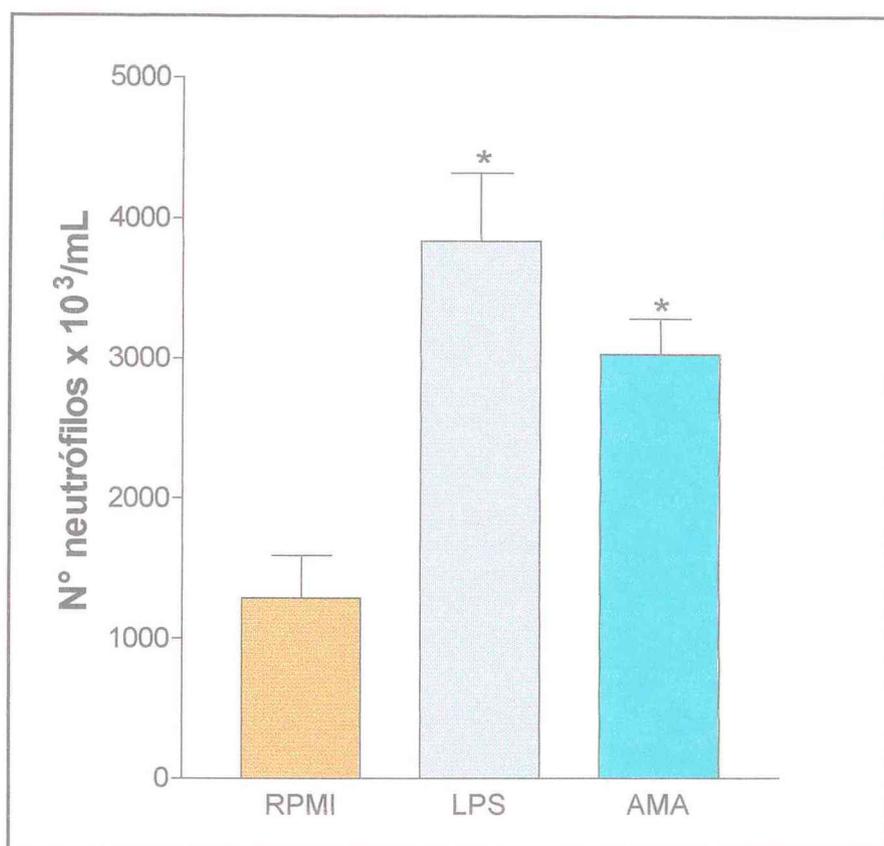


Figura 26. O sobrenadante de macrófagos em cultura estimulados com AMA apresenta atividade quimiotática para neutrófilos. Macrófagos (10^6 cells) em cultura foram estimulados ou não com AMA ($300\mu\text{g}/\text{mL}/\text{poço}$) durante 60 min ou com LPS ($10\mu\text{g}/\text{mL}/\text{poço}$). O poço controle recebeu apenas 1 mL de RPMI. O sobrenadante obtido foi administrado (1 mL/ i.p.) em animais normais e a avaliação da migração de neutrófilos foi mensurada 4 h após. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado ao grupo de macrófagos não estimulados (RPMI). ANOVA- Teste de Bonferroni.

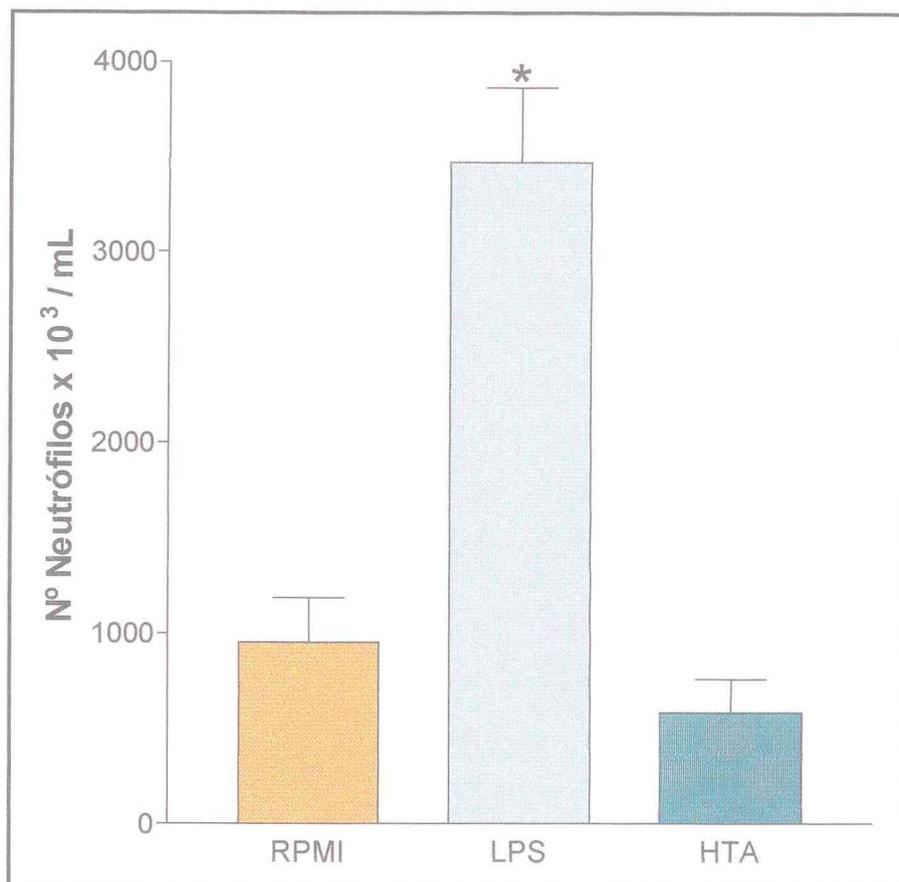


Figura 27. O sobrenadante de macrófagos em cultura estimulados com HTA não apresenta atividade quimiotática para neutrófilos. Macrófagos (10^6 cells) em cultura foram estimulados ou não com HTA ($300\mu\text{g}/\text{mL}/\text{poço}$) durante 60 min ou com LPS ($10\mu\text{g}/\text{mL}/\text{poço}$). O poço controle recebeu apenas 1 mL de RPMI. O sobrenadante obtido foi administrado (1 mL/ i.p.) em animais normais e a avaliação da migração de neutrófilos foi mensurada 4 h após. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado ao grupo de macrófagos não estimulados (RPMI). ANOVA- Teste de Bonferroni.

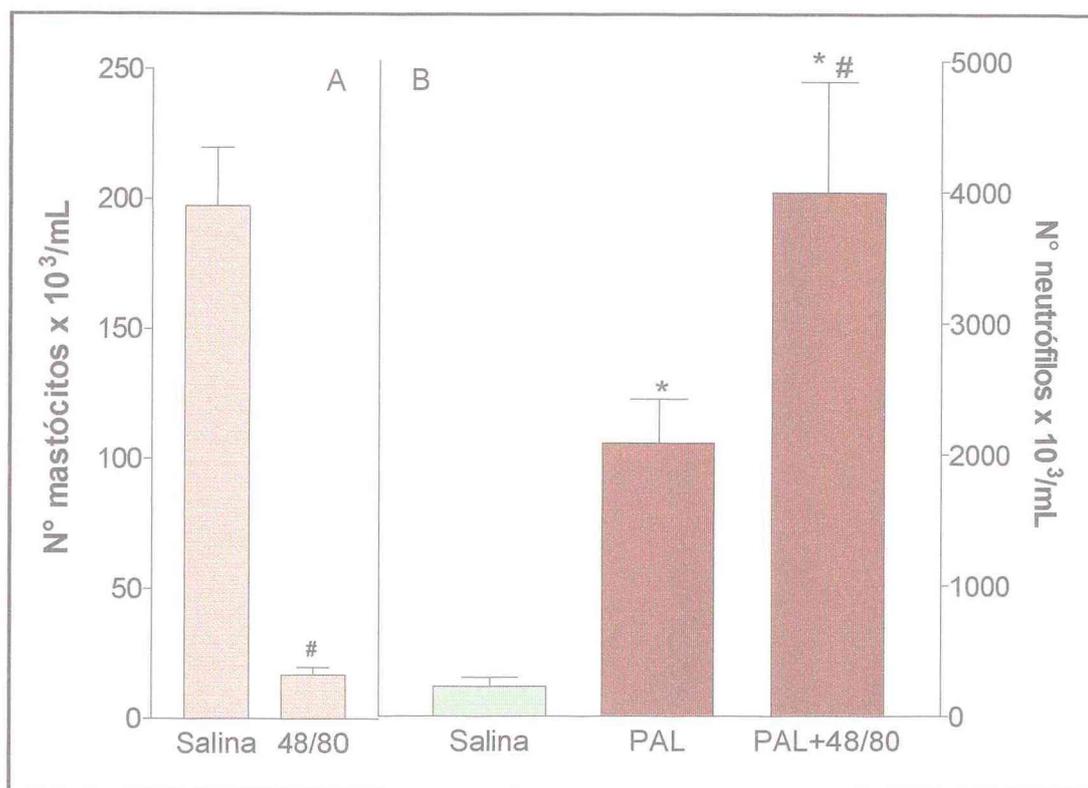


Figura 28. A depleção de mastócitos pelo pré-tratamento com o composto 48/80 potencia a migração de neutrófilos induzida por PAL. Painel A: População de mastócitos peritoneais em ratos controles (Salina) e pré-tratados com o composto 48/80 (48/80). **Painel B:** Migração de neutrófilos (MN) induzida por salina (Sal, 1 mL), ou PAL (200µg/mL/i.p.), nos controles e nos tratados com 48/80 (48/80). A MN foi avaliada 4 h após a injeção dos estímulos. Resultados expressos como média \pm E.P.M. de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina; # $p < 0,05$ comparado ao grupo não tratado com o composto 48/80. ANOVA- Teste de Bonferroni.

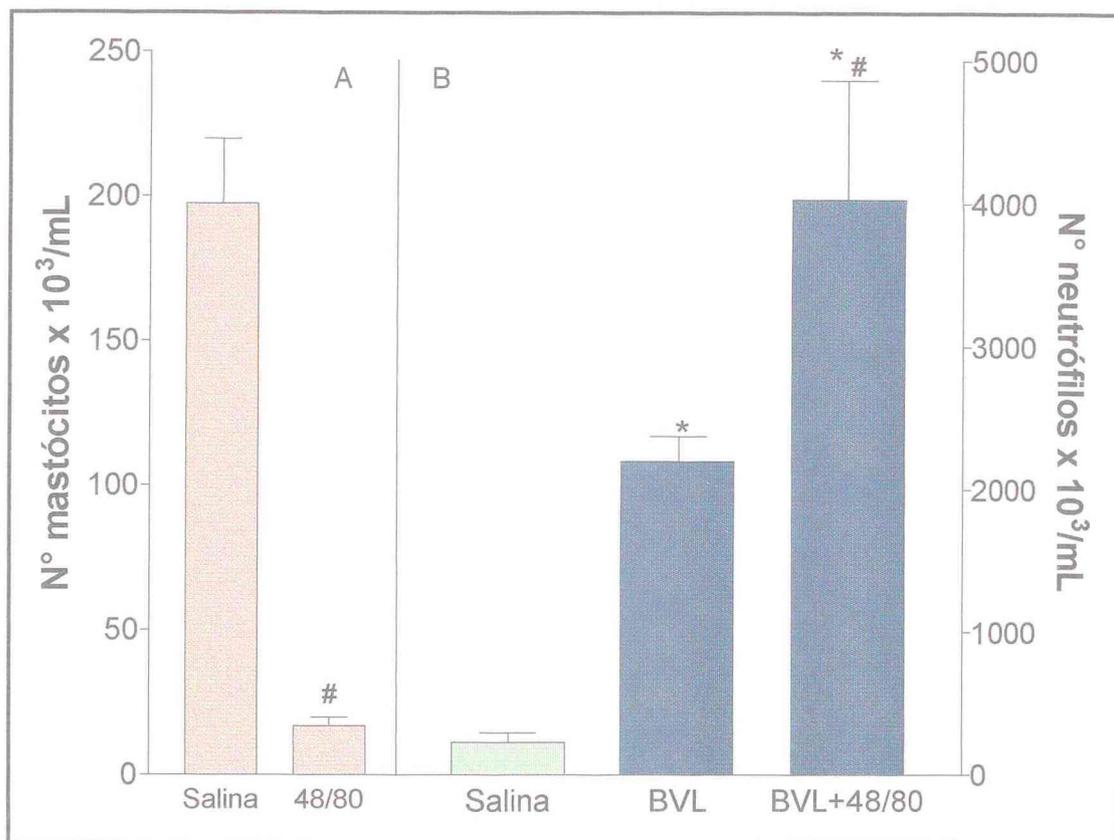


Figura 29. A depleção de mastócitos pelo pré-tratamento com o composto 48/80 potencia a migração de neutrófilos induzida por BVL. Painel A: População de mastócitos peritoneais em ratos controles (Salina) e pré-tratados com o composto 48/80 (48/80). **Painel B:** Migração de neutrófilos (MN) induzida por salina (Sal, 1 mL), ou BVL (200µg/mL/i.p.), nos controles e nos tratados com 48/80 (48/80). A MN foi avaliada 4 h após a injeção dos estímulos. Resultados expressos como média \pm E.P.M. de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina; # $p < 0,05$ comparado ao grupo não tratado com o composto 48/80. ANOVA- Teste de Bonferroni.

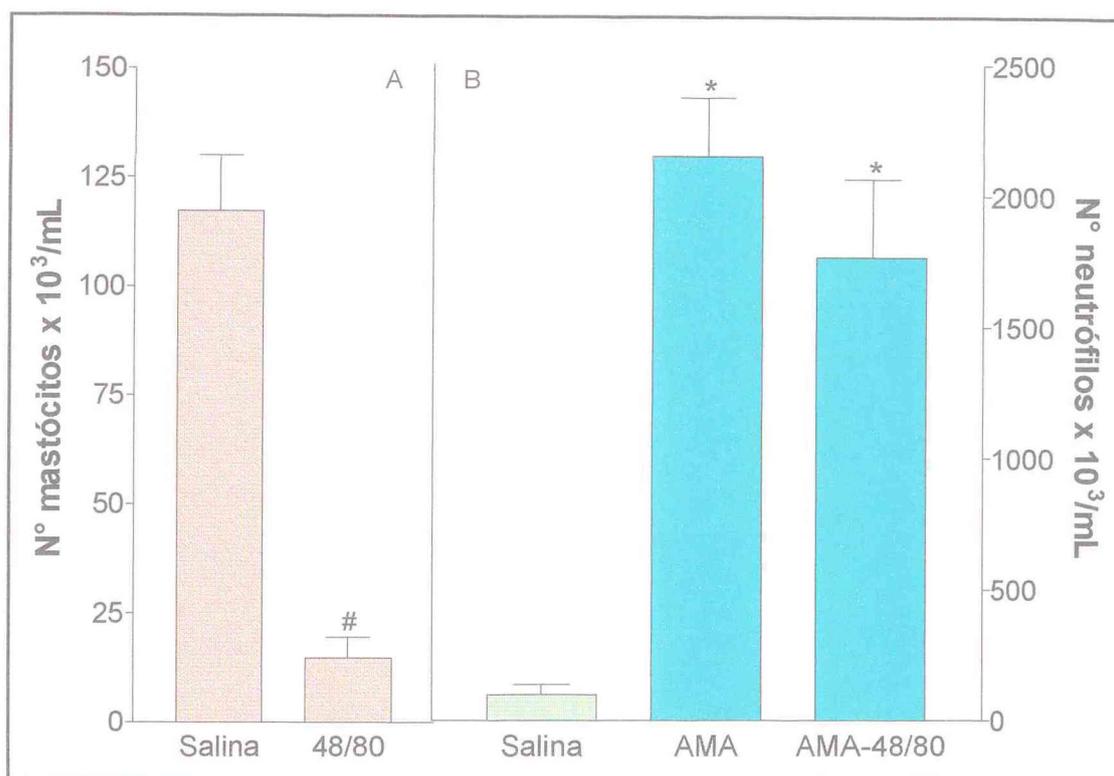


Figura 30. A depleção de mastócitos pelo pré-tratamento com o composto 48/80 não potencia a migração de neutrófilos induzida por AMA. Painel A: População de mastócitos peritoneais em ratos controles (Salina) e pré-tratados com o composto 48/80 (48/80). **Painel B:** Migração de neutrófilos (MN) induzida por salina (Sal, 1 mL), ou AMA (200µg/mL/i.p.), nos controles e nos tratados com 48/80 (48/80). A MN foi avaliada 4 h após a injeção dos estímulos. Resultados expressos como média ± E.P.M. de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina; # $p < 0,05$ comparado ao grupo não tratado com o composto 48/80. ANOVA- Teste de Bonferroni.

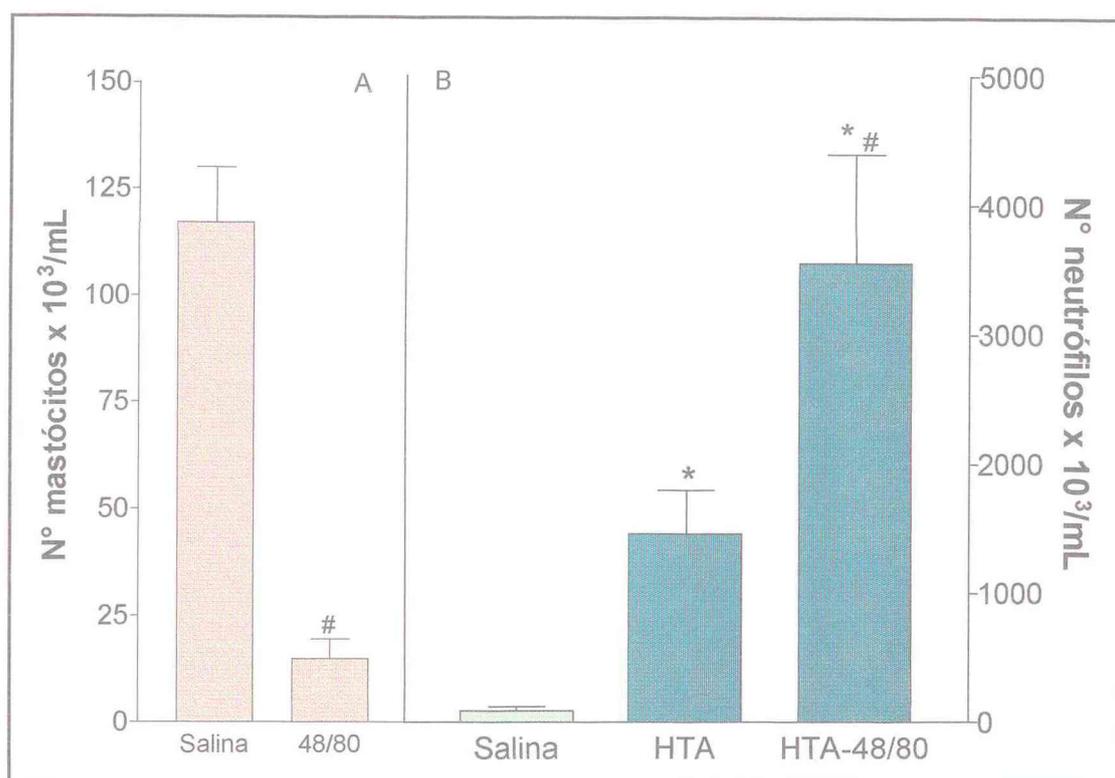


Figura 31. A depleção de mastócitos pelo pré-tratamento com o composto 48/80 potencia a migração de neutrófilos induzida por HTA. Painel A: População de mastócitos peritoneais em ratos controles (Salina) e pré-tratados com o composto 48/80 (48/80). **Painel B:** Migração de neutrófilos (MN) induzida por salina (Sal, 1 mL), ou HTA (200µg/mL/i.p.), nos controles e nos tratados com 48/80 (48/80). A MN foi avaliada 4 h após a injeção dos estímulos. Resultados expressos como média \pm E.P.M. de 5 animais. * $p < 0,05$ comparado ao grupo salina; # $p < 0,05$ comparado ao grupo não tratado com o composto 48/80. ANOVA- Teste de Bonferroni.

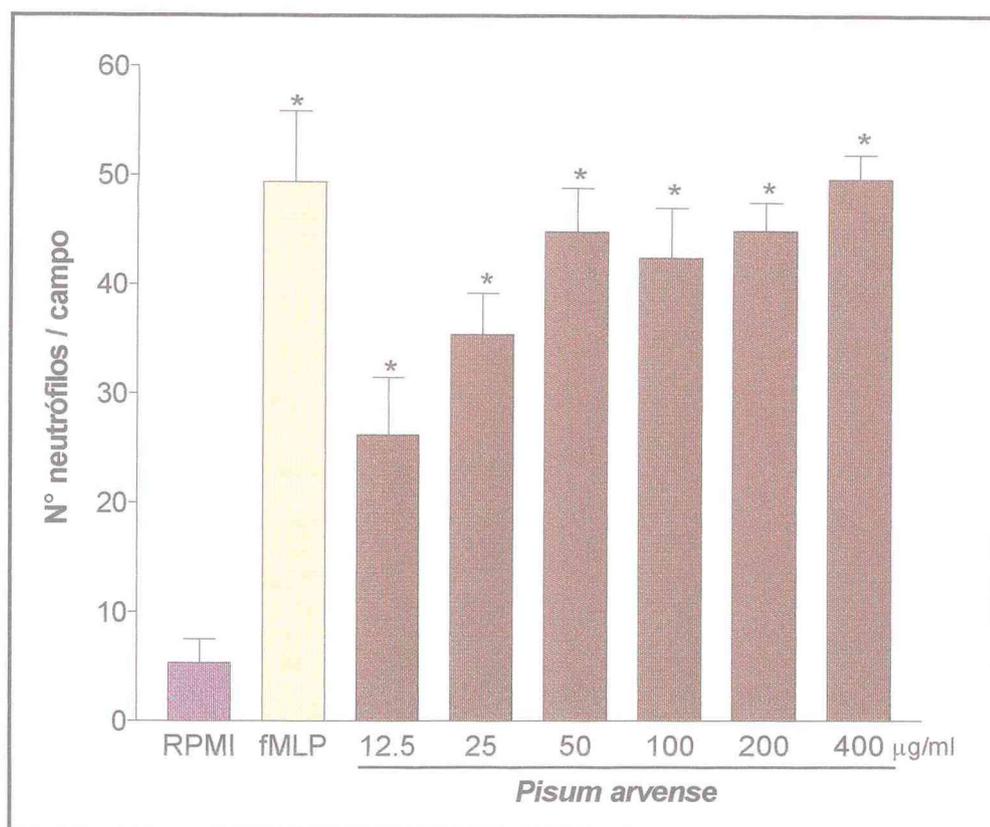


Figura 32. A lectina de *Pisum arvense* induz quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*.

A quimiotaxia de neutrófilos foi realizada em câmara de Boyden, com 48 poços. 28µL de uma solução de fMLP (10^{-6} M), PAL (12.5, 25, 50, 100, 200, e 400µg/mL) ou RPMI foram adicionadas à parte inferior da placa, e 50µL de neutrófilos de uma suspensão celular (10^6 células/mL), foram adicionados à parte superior. A migração foi avaliada após 1h. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. do n° de neutrófilos/campo, de um total de 5 campos/poço (6 poços/grupo). RPMI representa o controle negativo (migração randômica). * $p < 0,05$ em relação a RPMI. ANOVA; Bonferroni.

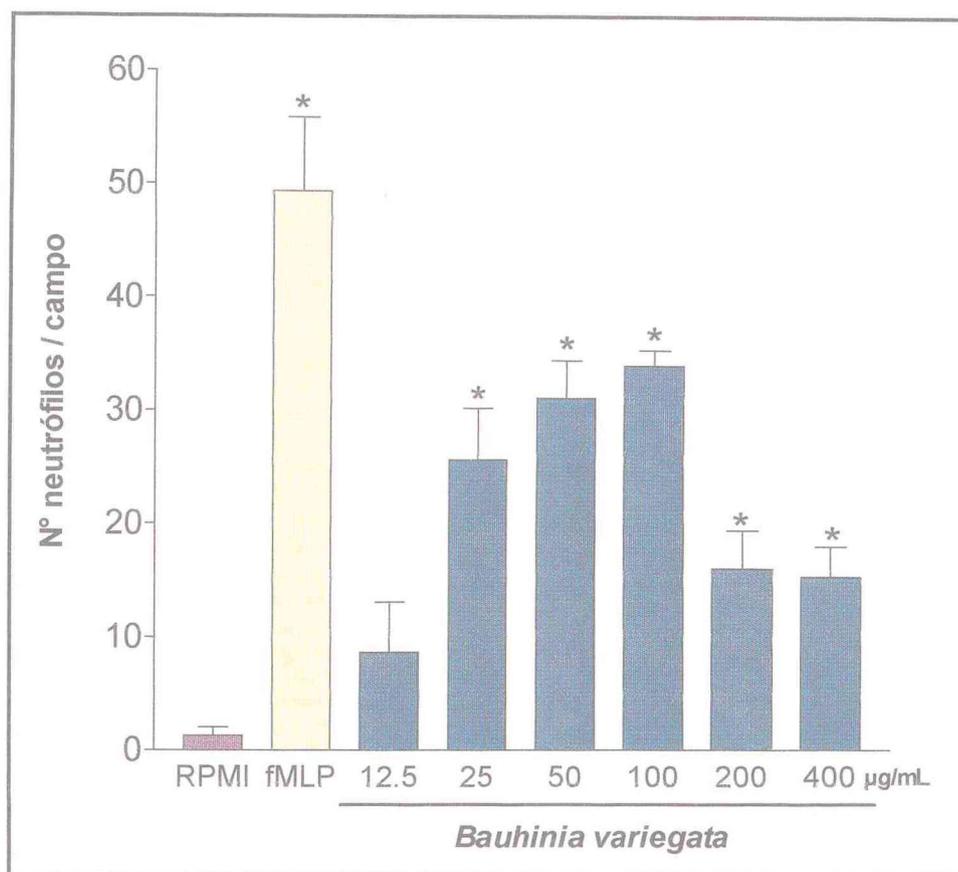


Figura 33. A lectina de *Bauhinia variegata* induz quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*. A quimiotaxia de neutrófilos foi realizada em câmara de Boyden, com 48 poços. 28µL de uma solução de fMLP (10^{-6} M), BVL (12.5, 25, 50, 100, 200, e 400µg/mL) ou RPMI foram adicionadas à parte inferior da placa, e 50µL de neutrófilos de uma suspensão celular (10^6 células/mL), foram adicionados à parte superior. A migração foi avaliada após 1h. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. do n° de neutrófilos/campo, de um total de 5 campos/poço (6 poços/grupo). RPMI representa o controle negativo (migração randômica). * $p < 0,05$ em relação a RPMI. ANOVA; Bonferroni.

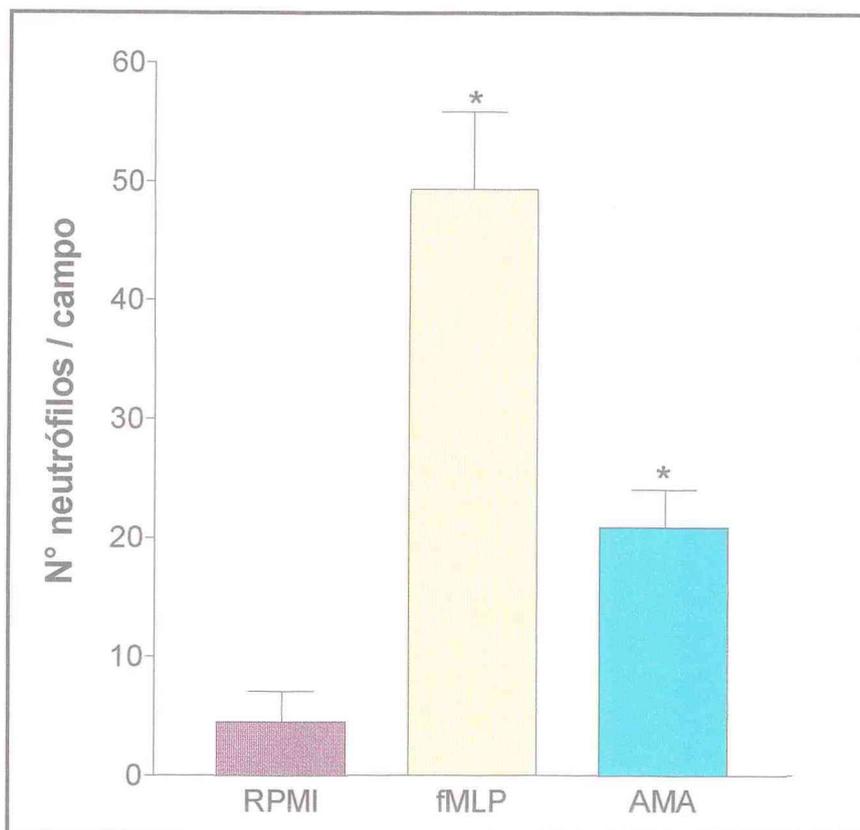


Figura 34. A lectina de *Arum maculatum* induz quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*. A quimiotaxia de neutrófilos foi realizada em câmara de Boyden, com 48 poços. 28 μ L de uma solução de fMLP (10^{-6} M), AMA (300 μ g/mL) ou RPMI foram adicionadas à parte inferior da placa, e 50 μ L de neutrófilos de uma suspensão celular (10^6 células/mL), foram adicionados à parte superior. A migração foi avaliada após 1h. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. do n° de neutrófilos/campo, de um total de 5 campos/poço (6 poços/grupo). RPMI representa o controle negativo (migração randômica). * $p < 0,05$ em relação a RPMI. ANOVA; Bonferroni.

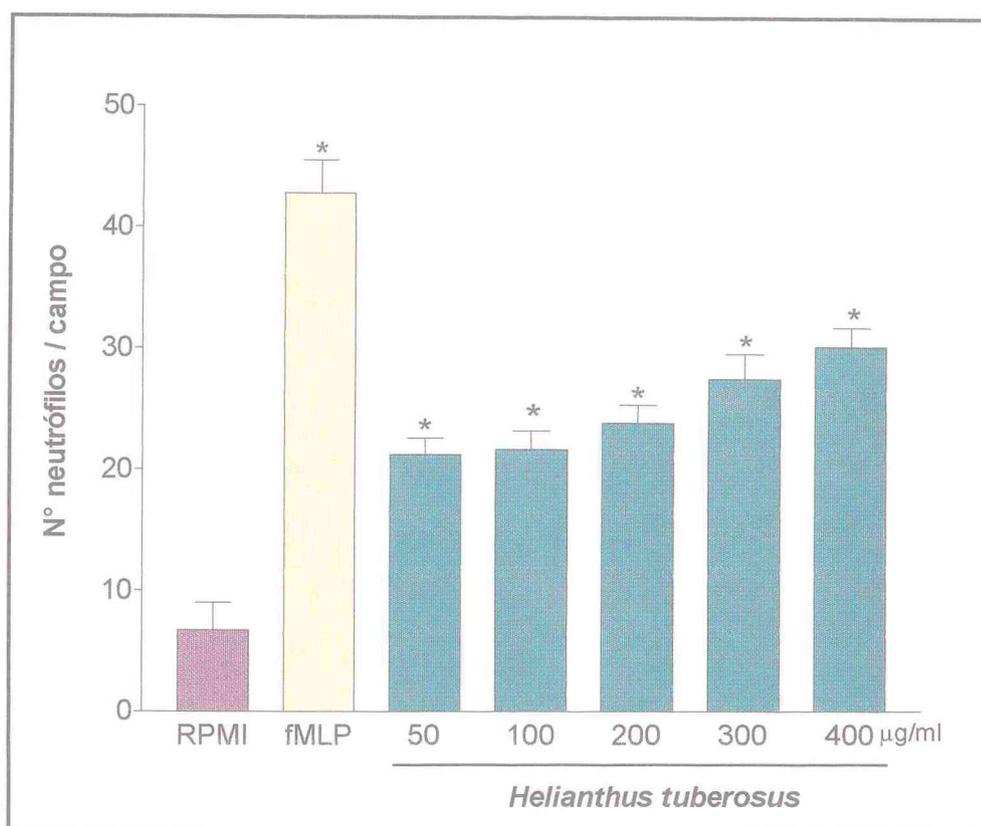


Figura 35. A lectina de *Helianthus tuberosus* induz quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*. A quimiotaxia de neutrófilos foi realizada em câmara de Boyden, com 48 poços. 28µL de uma solução de fMLP (10^{-6} M), HTA (50, 100, 200, 300 e 400µg/mL) ou RPMI foram adicionadas à parte inferior da placa, e 50µL de neutrófilos de uma suspensão celular (10^6 células/mL), foram adicionados à parte superior. A migração foi avaliada após 1h. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. do n° de neutrófilos/campo, de um total de 5 campos/poço (6 poços/grupo). RPMI representa o controle negativo (migração randômica). * $p < 0,05$ em relação a RPMI. ANOVA; Bonferroni.

5. ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DA INTERAÇÃO DAS LECTINAS DE *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus* AOS MACRÓFAGOS DE RATOS.

As citometrias de fluxo realizadas para mensurar as intensidades de fluorescência emitidas por macrófagos de ratos incubados com as lectinas PAL, BVL, AMA e HTA, marcadas com FITC, mostraram que essas lectinas são capazes de ligarem-se à estas células. No entanto, a intensidade de fluorescência emitida pelo complexo célula-lectina/FITC, mostrou-se variável de acordo com a lectina. O controle de viabilidade celular das amostras utilizadas, foi analisado por citometria de fluxo, e tivemos como resultado que as quatro lectinas não induziram morte celular (**Tabela 2**).

Na **figura 36** observamos que a lectina de *Arum maculatum* foi a lectina que apresentou maior interação aos macrófagos de ratos, 625% de aumento da intensidade de fluorescência, emitida pelas células em PBS (auto-fluorescência), seguida por *Bauhinia variegata* (479%), e *Pisum arvense* (238%), sendo a lectina de *Helianthus tuberosus* que apresentou menor interação (89%).

A análise dos histogramas de fluorescência nos mostra que, as lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*, todas na concentração de 20µg, marcadas com FITC, ligaram-se aos macrófagos de ratos significativamente, apresentando picos entre 5 e 7, e média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pelo complexo lectina/célula, iguais a 9.11, 15.83, 19.52 e 5.10 respectivamente (unidades arbitrárias). As auto-fluorescências emitidas pelos macrófagos em PBS, apresentaram um histograma com pico de no

máximo de 2 e média geométrica variando de 2.69 à 2.76 (unidades arbitrárias).

(Figura 37, 38, 39, 40 e Tabela 2).

TABELA 2. ANÁLISE DA INTERAÇÃO DAS LECTINAS DE *Pisum arvense*, *Bauhinia Variiegta*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*, MARCADAS COM FITC, AOS MACRÓFAGOS DE RATOS.

Amostras		Média geométrica da intensidade de Fluorescência (UA)	Pico do histograma da intensidade de Fluorescência	% de células vivas
Grupo PAL	Controle	2.69	2	100
	BSA/FITC	2.76	2	99.80
	PAL/FITC	9.11*	5	95.12
Grupo BVL	Controle	2.73	2	100
	BSA/FITC	3.65	3	99.60
	BVL/FITC	15.83*	7	98.72
Grupo AMA	Controle	2.69	2	100
	BSA/FITC	2.76	2	99.80
	AMA/FITC	19.52*	5	99.57
Grupo HTA	Controle	2.69	2	100
	BSA/FITC	2.76	2	99.80
	HTA/FITC	5.10*	5	99.42

"UA: Unidades Arbitrárias;

5.000 células foram analisadas pelo programa "Cell Quest Software" *p<0.001 em relação ao controle, usando o teste Kolmogorov-Smirnoff.

O pico do histograma é calculado pelo próprio programa.

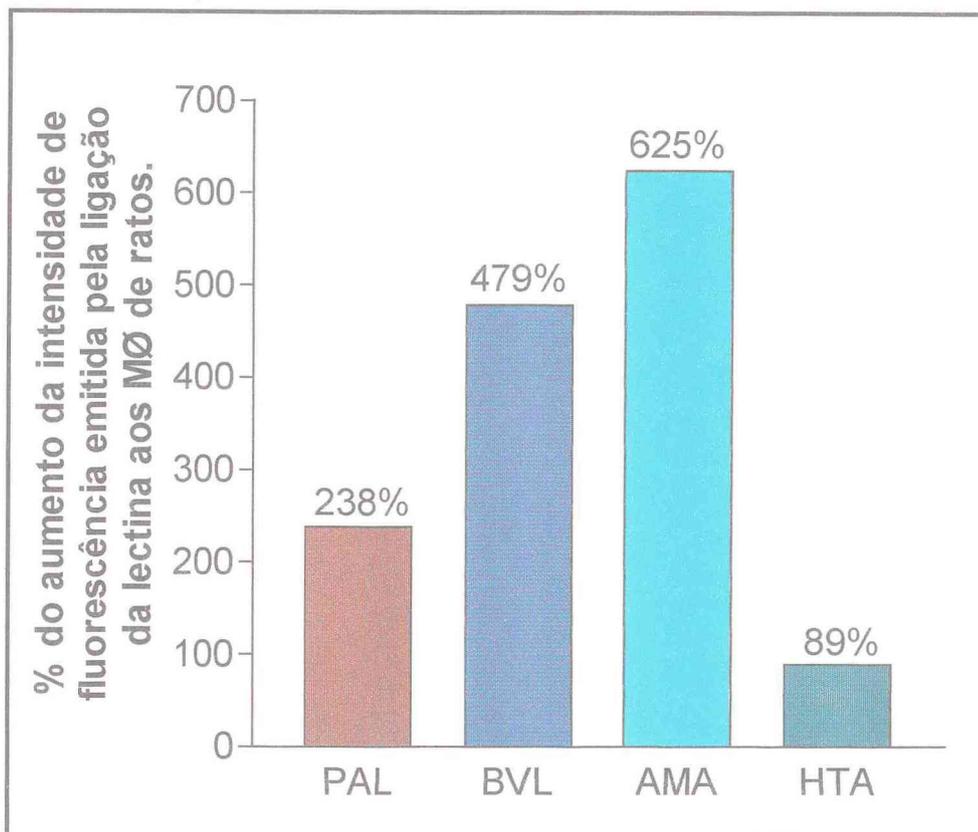


Figura 36: Porcentagem do aumento da Intensidade de Fluorescência emitida por macrófagos de ratos incubados com as lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*. As barras representam as porcentagens do aumento das intensidades de fluorescência emitidas por macrófagos incubados com as lectinas PAL, BVL, AMA e HTA, marcadas com FITC, em relação ao controle (auto-fluorescência dos macrófagos) de cada lectina individualmente (controles não mostrados, equivalentes a zero no gráfico).

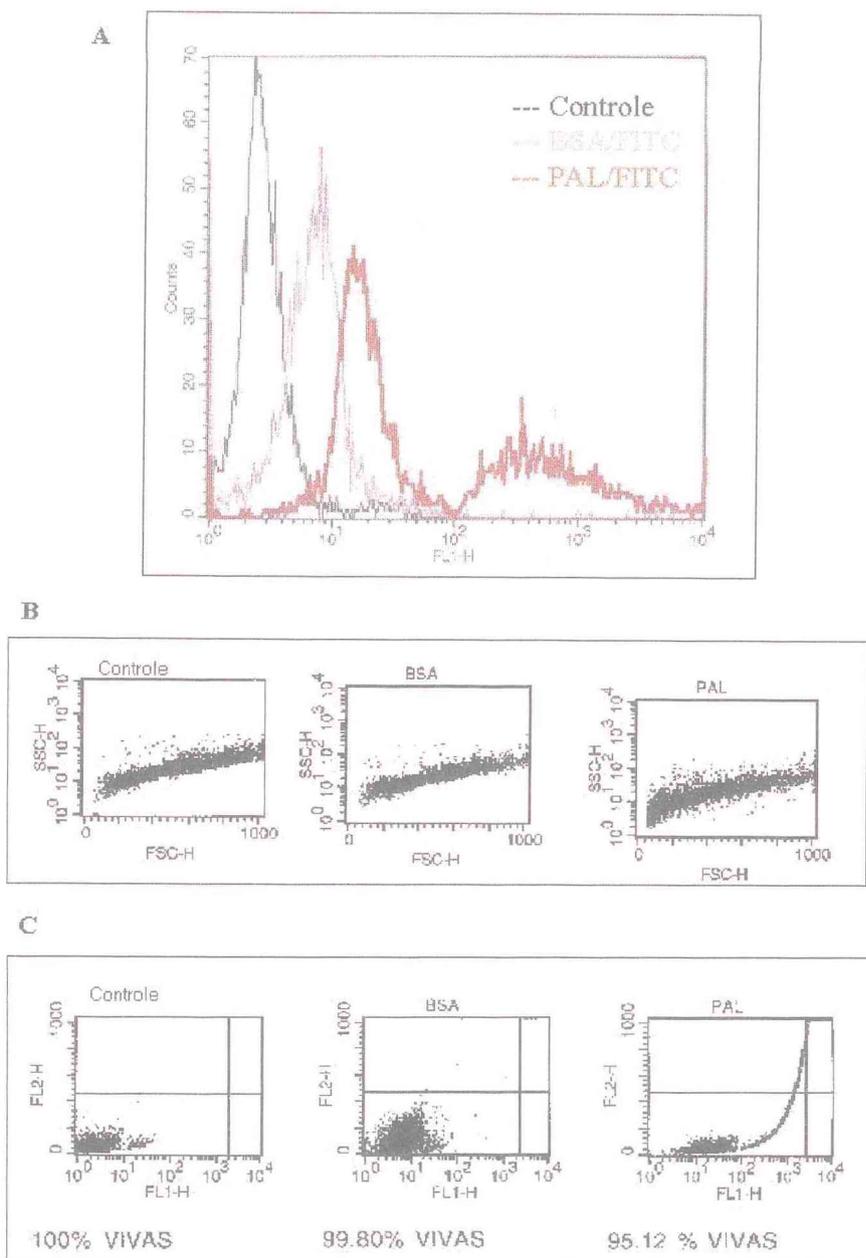


Figura 37: Interação da lectina de *Pisum arvense* marcada com FITC à macrófagos de ratos. Em **A** e **B**, macrófagos de ratos (10^6 células) foram incubados durante 30min a 4°C com PBS (controle), ou BSA/FITC ($20\mu\text{g}$), ou PAL/FITC($20\mu\text{g}$). Os macrófagos foram lavados, ressuspensos em PBS ($400\mu\text{L}$) e a intensidade de fluorescência (luz verde FL-1) emitida por 5.000 células de cada amostra foi mensurada. Em **C**, as amostras foram incubadas por mais 10min com $10\mu\text{L}$ de iodeto de propídio, e a viabilidade celular foi avaliada mensurando-se a intensidade de fluorescência (luz vermelha - FL2) emitida também por 5.000 células de cada amostra. Em **A**, mostramos o histograma da intensidade de fluorescência (FL1-1); em **B**, as populações dos macrófagos mensurados em relação ao tamanho (FSC-H) e a granulação (SSC-H); e em **C**, a viabilidade celular expressa por porcentagem de células vivas. Os dados foram analisados pelo programa "Cell Quest Software".

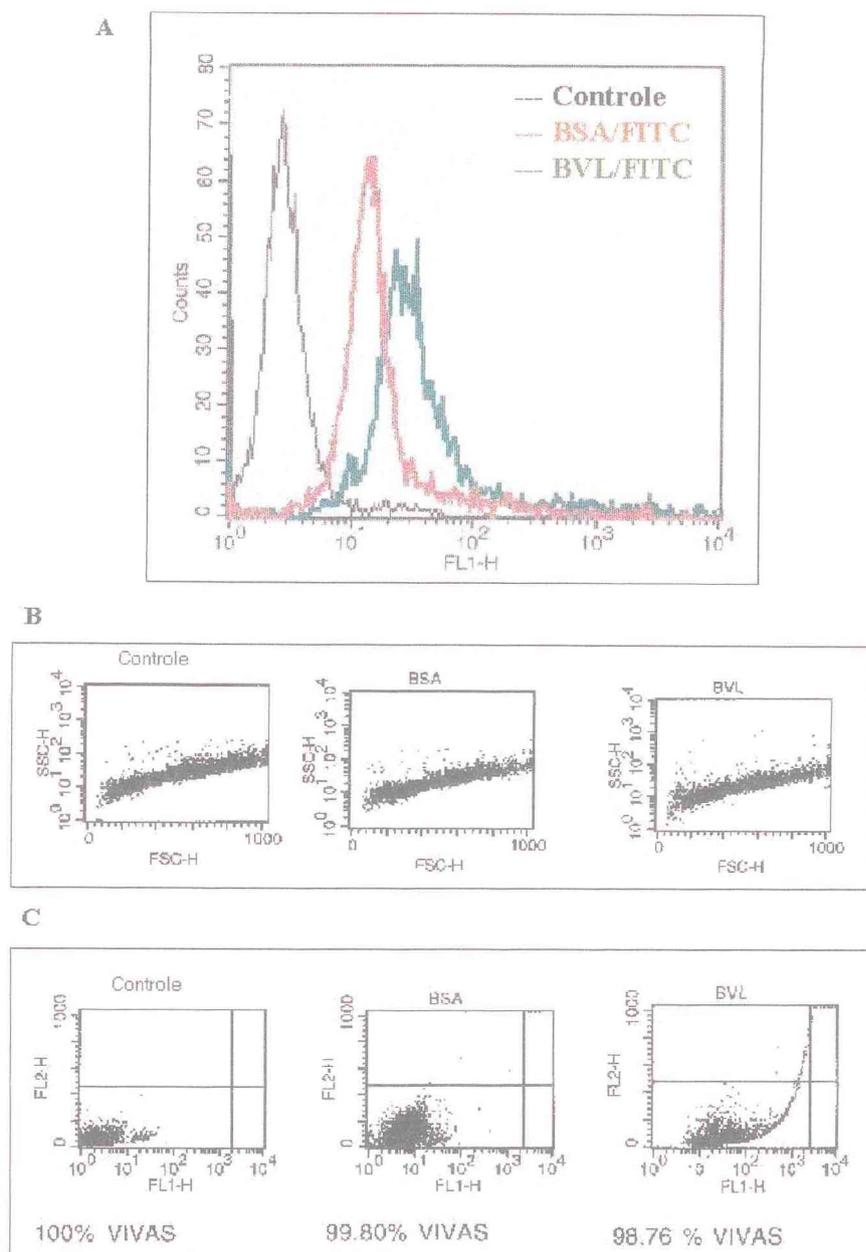


Figura 38: Interação da lectina de *Bauhinia variegata* marcada com FITC à macrófagos de ratos. Em **A** e **B**, macrófagos de ratos (10^6 células) foram incubados durante 30min a 4°C com PBS (controle), ou BSA/FITC ($20\mu\text{g}$), ou BVL/FITC($20\mu\text{g}$). Os macrófagos foram lavados, ressuspensos em PBS ($400\mu\text{L}$) e a intensidade de fluorescência (luz verde FL-1) emitida por 5.000 células de cada amostra foi mensurada. Em **C**, as amostras foram incubadas por mais 10min com $10\mu\text{L}$ de iodeto de propídio, e a viabilidade celular foi avaliada mensurando-se a intensidade de fluorescência (luz vermelha - FL2) emitida também por 5.000 células de cada amostra. Em **A**, mostramos o histograma da intensidade de fluorescência (FL1-1); em **B**, as populações dos macrófagos mensurados em relação ao tamanho (FSC-H) e a granulação (SSC-H); e em **C**, a viabilidade celular expressa por porcentagem de células vivas. Os dados foram analisados pelo programa "Cell Quest Software".

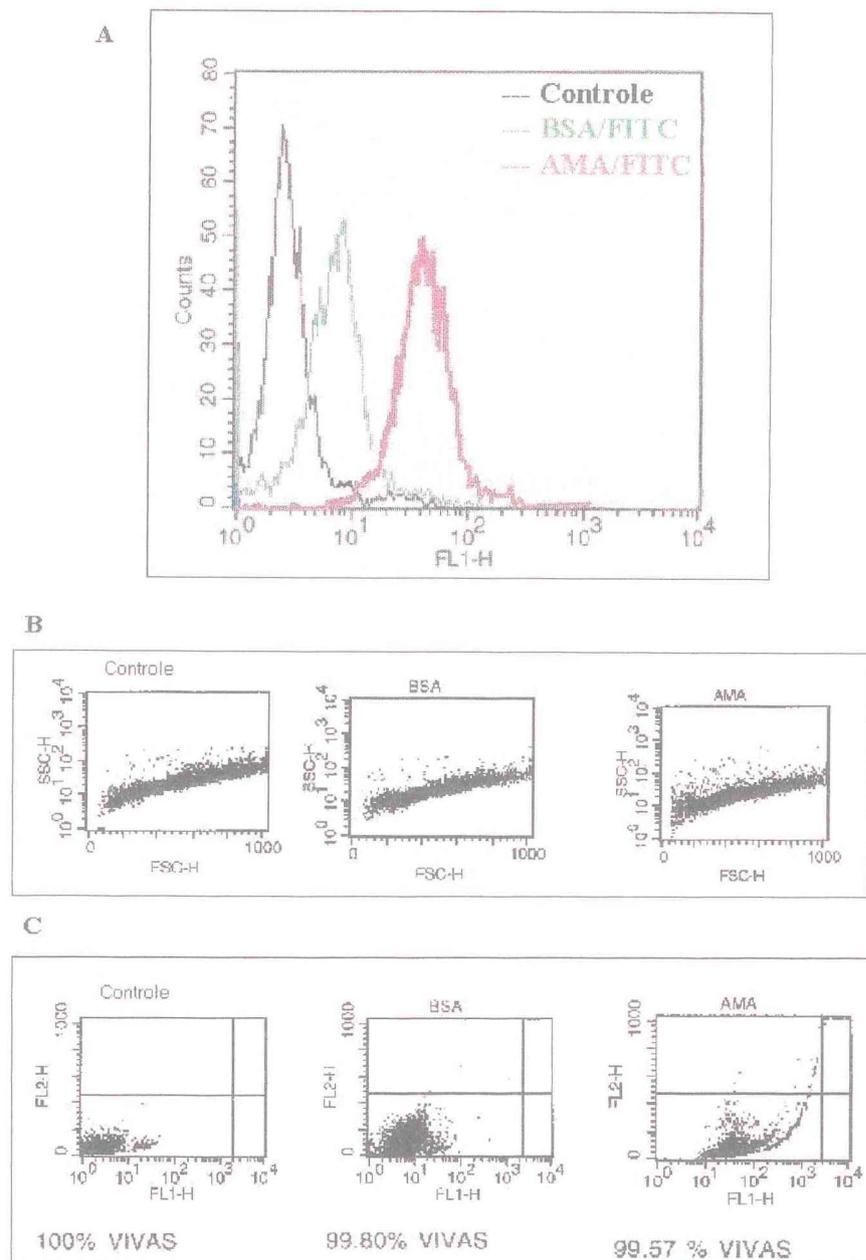


Figura 39: Interação da lectina de *Arum maculatum* marcada com FITC à macrófagos de ratos. Em **A** e **B**, macrófagos de ratos (10^6 células) foram incubados durante 30min a 4°C com PBS (controle), ou BSA/FITC ($20\mu\text{g}$), ou AMA/FITC($20\mu\text{g}$). Os macrófagos foram lavados, ressuspensos em PBS ($400\mu\text{L}$) e a intensidade de fluorescência (luz verde FL-1) emitida por 5.000 células de cada amostra foi mensurada. Em **C**, as amostras foram incubadas por mais 10min com $10\mu\text{L}$ de lodado de propídio, e a viabilidade celular foi avaliada mensurando-se a intensidade de fluorescência (luz vermelha - FL2) emitida também por 5.000 células de cada amostra. Em **A**, mostramos o histograma da intensidade de fluorescência (FL1-1); em **B**, as populações dos macrófagos mensurados em relação ao tamanho (FSC-H) e a granulação (SSC-H); e em **C**, a viabilidade celular expressa por porcentagem de células vivas. Os dados foram analisados pelo programa "Cell Quest Software".

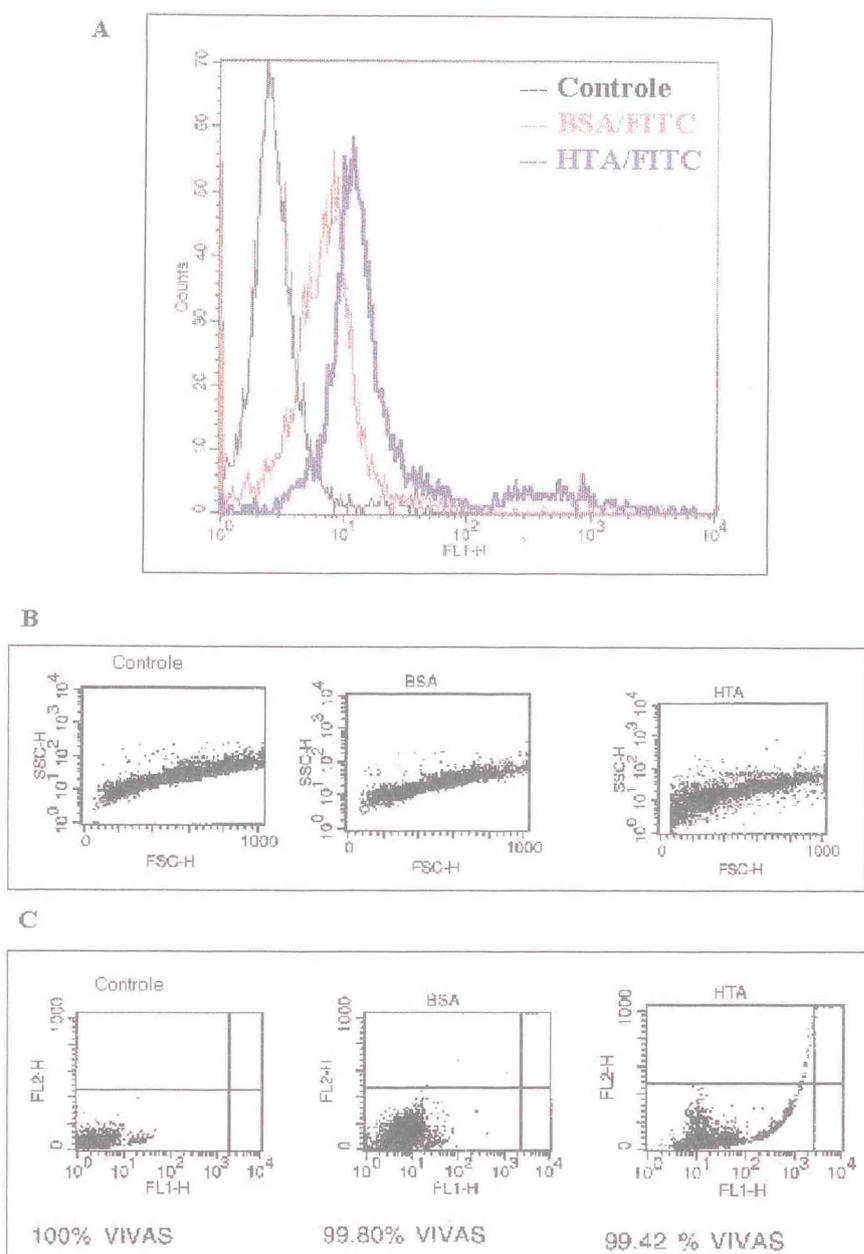


Figura 40: Interação da lectina de *Helianthus tuberosus* marcada com FITC à macrófagos de ratos. Em **A** e **B**, macrófagos de ratos (10^6 células) foram incubados durante 30min a 4°C com PBS (controle), ou BSA/FITC ($20\mu\text{g}$), ou HTA/FITC($20\mu\text{g}$). Os macrófagos foram lavados, ressuspensos em PBS ($400\mu\text{L}$) e a intensidade de fluorescência (luz verde FL-1) emitida por 5.000 células de cada amostra foi mensurada. Em **C**, as amostras foram incubadas por mais 10min com $10\mu\text{L}$ de Iodeto de propídio, e a viabilidade celular foi avaliada mensurando-se a intensidade de fluorescência (luz vermelha - FL2) emitida também por 5.000 células de cada amostra. Em **A**, mostramos o histograma da intensidade de fluorescência (FL1-1); em **B**, as populações dos macrófagos mensurados em relação ao tamanho (FSC-H) e a granulação (SSC-H); e em **C**, a viabilidade celular expressa por porcentagem de células vivas. Os dados foram analisados pelo programa "Cell Quest Software".

6. ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DA INTERAÇÃO DAS LECTINAS DE *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus* A MASTÓCITOS DE RATOS.

No estudo com mastócitos de ratos em citômetro de fluxo, as lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*, mostraram ligarem-se significativamente aos mastócitos. Semelhante aos macrófagos de ratos, as interações dessas lectinas as células mostraram-se diferentes de acordo com a lectina. O controle da viabilidade celular, mensurado também em citômetro de fluxo, pela marcação das células mortas por iodeto de propídio, nos mostrou que as quatro lectinas não induziram morte celular (**Figuras 42, 43, 44, 45 e Tabela 3**).

Na **figura 41** observamos que foi a lectina de *Pisum arvense* que apresentou maior interação aos mastócitos de ratos, 363% de aumento da intensidade de fluorescência, emitida pelas células em PBS (auto-fluorescência), seguida pelas lectinas de *Arum maculatum* (279%), *Helianthus tuberosus* (187%) e por fim de *Bauhinia variegata* (136%).

A análise dos histogramas da intensidade de fluorescência nos mostra que as lectinas *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*, todas na concentração de 20µg, marcadas com FITC, ligam-se a mastócitos de ratos significativamente, apresentando picos do histograma de e média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pelo complexo lectina/célula, iguais a 13.71, 6.73, 7.90 e 5.97 (unidades arbitrárias). Os mastócitos em PBS emitiram uma auto-fluorescência que apresentaram pico de 1 e média

geométrica da intensidade de fluorescência entre 2.08 e 2.84 (unidades arbitrárias) (Figuras 42, 43, 44, 45 e Tabela 3).

TABELA 3. ANÁLISE DA INTERAÇÃO DAS LECTINAS DE *Pisum arvense*, *Bauhinia Variiegta*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*, MARCADAS COM FITC, AOS MASTÓCITOS DE RATOS.

Amostras		Média geométrica da intensidade de Fluorescência (UA)	Pico do histograma da intensidade de Fluorescência	% de células vivas
Grupo PAL	Controle	2.84	1	99.07
	BSA/FITC	3.02	1	99.40
	PAL/FITC	13.17*	3	98.13
Grupo BVL	Controle	2.84	1	99.07
	BSA/FITC	3.02	1	99.40
	BVL/FITC	6.73*	3	99.23
Grupo AMA	Controle	2.08	1	99.07
	BSA/FITC	2.20	1	99.40
	AMA/FITC	7.90*	3	97.53
Grupo HTA	Controle	2.08	1	99.07
	BSA/FITC	2.20	1	99.40
	HTA/FITC	5.97*	3	98.93

"UA: Unidades Arbitrárias;

5.000 células foram analisadas pelo programa "Cell Quest Software" *p<0.001 em relação ao controle, usando o teste Kolmogorov-Smirnoff.

O pico do histograma é calculado pelo próprio programa.

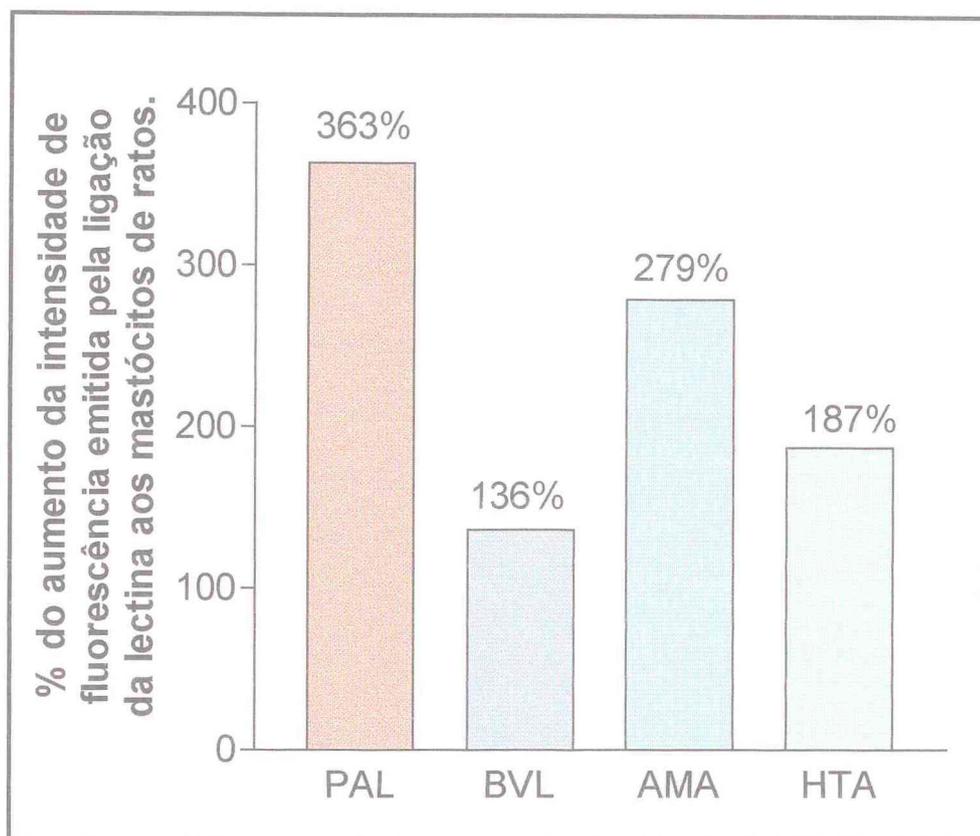


Figura 41: Porcentagem do aumento da Intensidade de Fluorescência emitida por mastócitos de ratos incubados com as lectinas *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*. As barras representam as porcentagens do aumento das intensidades de fluorescência emitidas por mastócitos incubados com as lectinas PAL, BVL, AMA e HTA, marcadas com FITC, em relação ao controle (auto-fluorescência dos mastócitos) de cada lectina individualmente (controles não mostrados, equivalentes a zero no gráfico).

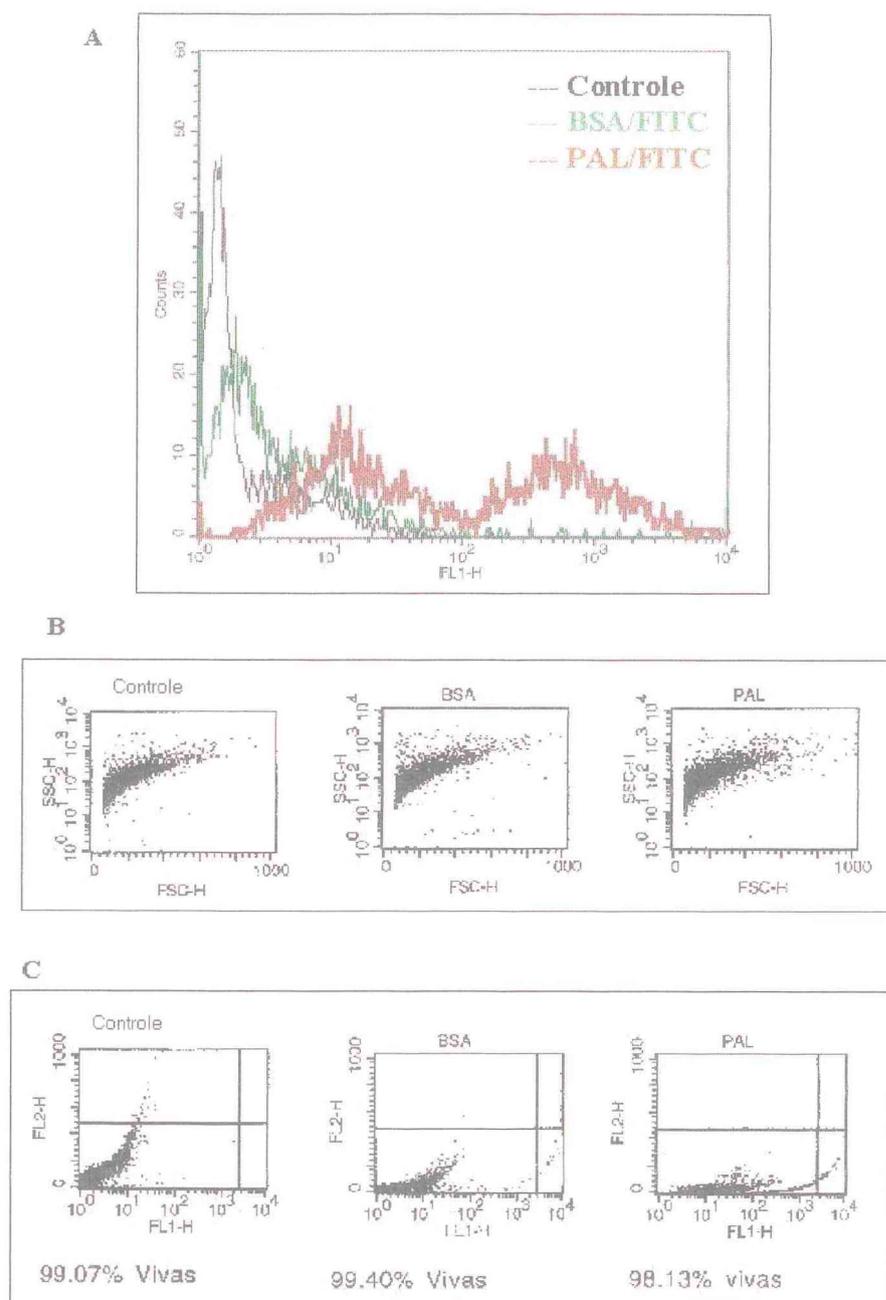


Figura 42: Interação da lectina de *Pisum arvense* marcada com FITC à mastócitos de ratos. Em **A** e **B**, mastócitos de ratos (10^6 células) foram incubados durante 30min a 4°C com PBS (controle), ou BSA/FITC ($20\mu\text{g}$), ou PAL/FITC($20\mu\text{g}$). Os mastócitos foram lavados, ressuspensos em PBS ($400\mu\text{L}$) e a intensidade de fluorescência (luz verde FL-1) emitida por 5.000 células de cada amostra foi mensurada. Em **C**, as amostras foram incubadas por mais 10min com $10\mu\text{L}$ de iodido de propídio, e a viabilidade celular foi avaliada mensurando-se a intensidade de fluorescência (luz vermelha - FL2) emitida também por 5.000 células de cada amostra. Em **A**, mostramos o histograma da intensidade de fluorescência (FL1-1); em **B**, as populações dos mastócitos mensurados em relação ao tamanho (FSC-H) e a granulação (SSC-H); e em **C**, a viabilidade celular expressa por porcentagem de células vivas. Os dados foram analisados pelo programa "Cell Quest Software".

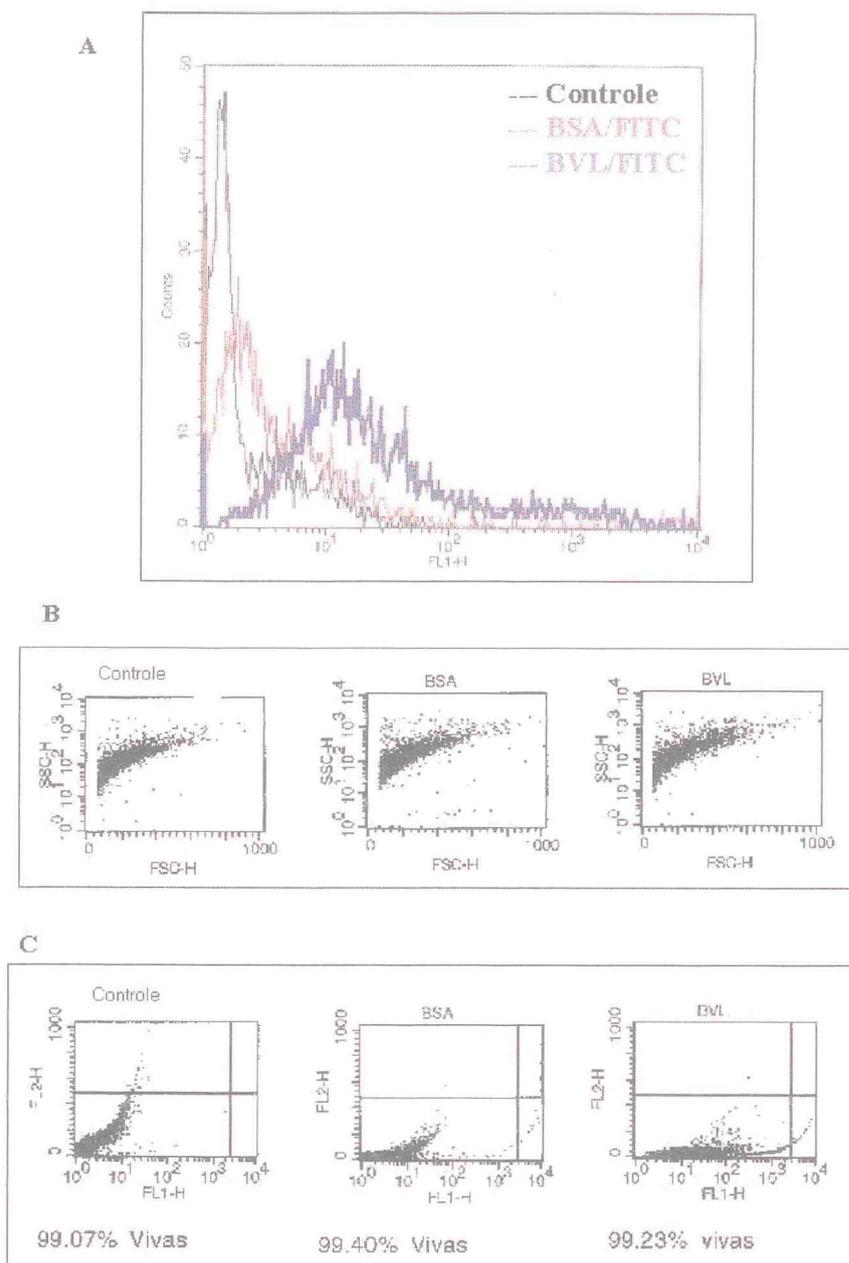


Figura 43: Interação da lectina de *Bauhinia variegata* marcada com FITC à mastócitos de ratos. Em **A** e **B**, mastócitos de ratos (10^6 células) foram incubados durante 30min a 4°C com PBS (controle), ou BSA/FITC ($20\mu\text{g}$), ou BVL/FITC($20\mu\text{g}$). Os mastócitos foram lavados, ressuspensos em PBS ($400\mu\text{L}$) e a intensidade de fluorescência (luz verde FL-1) emitida por 5.000 células de cada amostra foi mensurada. Em **C**, as amostras foram incubadas por mais 10min com $10\mu\text{L}$ de iodado de propídio, e a viabilidade celular foi avaliada mensurando-se a intensidade de fluorescência (luz vermelha - FL2) emitida também por 5.000 células de cada amostra. Em **A**, mostramos o histograma da intensidade de fluorescência (FL1-1); em **B**, as populações dos mastócitos mensurados em relação ao tamanho (FSC-H) e a granulação (SSC-H); e em **C**, a viabilidade celular expressa por porcentagem de células vivas. Os dados foram analisados pelo programa "Cell Quest Software".

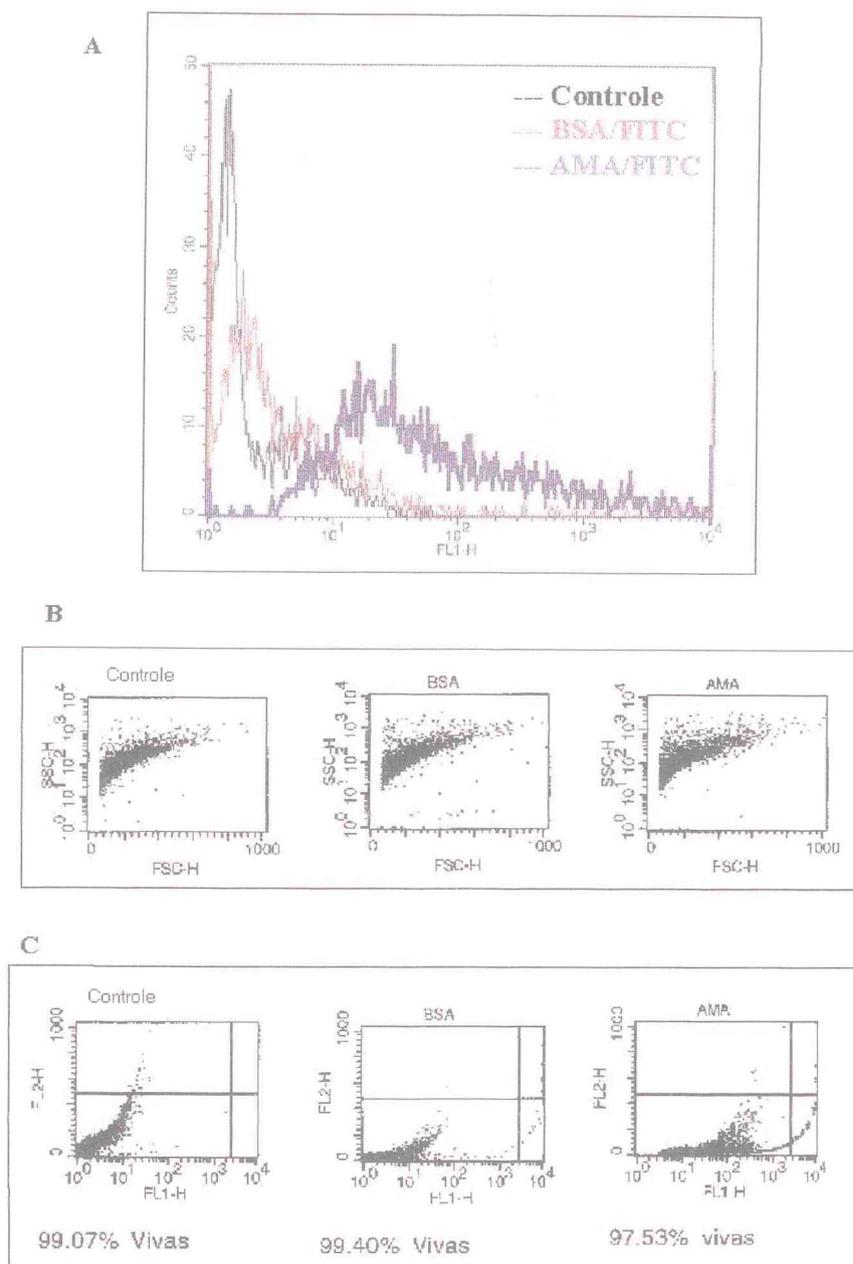


Figura 44: Interação da lectina de *Arum maculatum* marcada com FITC à mastócitos de ratos. Em **A** e **B**, mastócitos de ratos (10^6 células) foram incubados durante 30min a 4°C com PBS (controle), ou BSA/FITC ($20\mu\text{g}$), ou AMA/FITC($20\mu\text{g}$). Os mastócitos foram lavados, ressuspensos em PBS ($400\mu\text{L}$) e a intensidade de fluorescência (luz verde FL-1) emitida por 5.000 células de cada amostra foi mensurada. Em **C**, as amostras foram incubadas por mais 10min com $10\mu\text{L}$ de iodado de propídio, e a viabilidade celular foi avaliada mensurando-se a intensidade de fluorescência (luz vermelha - FL2) emitida também por 5.000 células de cada amostra. Em **A**, mostramos o histograma da intensidade de fluorescência (FL1-1); em **B**, as populações dos mastócitos mensurados em relação ao tamanho (FSC-H) e a granulação (SSC-H); e em **C**, a viabilidade celular expressa por porcentagem de células vivas. Os dados foram analisados pelo programa "Cell Quest Software".

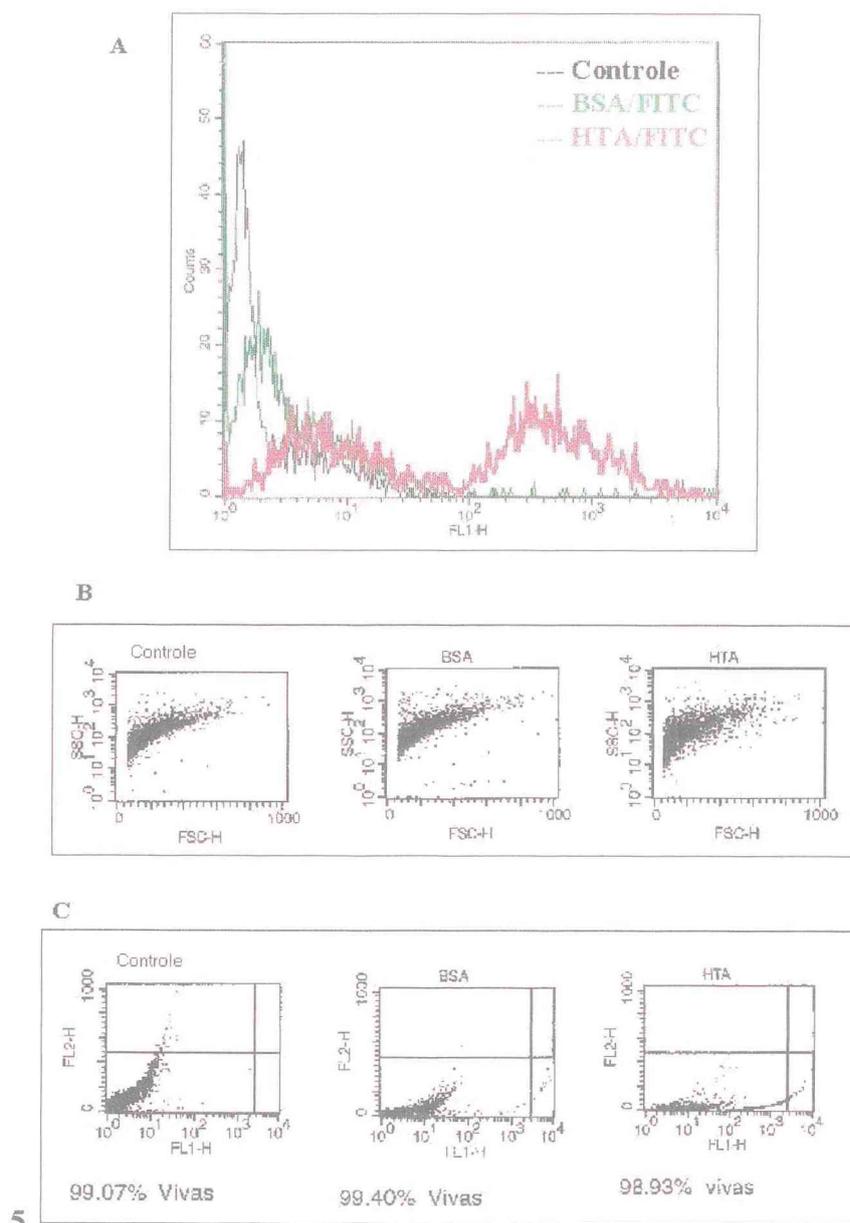


Figura 45: Interação da lectina de *Helianthus tuberosus* marcada com FITC à mastócitos de ratos. Em **A** e **B**, mastócitos de ratos (10^6 células) foram incubados durante 30min a 4°C com PBS (controle), ou BSA/FITC ($20\mu\text{g}$), ou HTA/FITC($20\mu\text{g}$). Os mastócitos foram lavados, ressuspensos em PBS ($400\mu\text{L}$) e a intensidade de fluorescência (luz verde FL-1) emitida por 5.000 células de cada amostra foi mensurada. Em **C**, as amostras foram incubadas por mais 10min com $10\mu\text{L}$ de lodo de propídio, e a viabilidade celular foi avaliada mensurando-se a intensidade de fluorescência (luz vermelha - FL2) emitida também por 5.000 células de cada amostra. Em **A**, mostramos o histograma da intensidade de fluorescência (FL1-1); em **B**, as populações dos mastócitos mensurados em relação ao tamanho (FSC-H) e a granulação (SSC-H); e em **C**, a viabilidade celular expressa por porcentagem de células vivas. Os dados foram analisados pelo programa "Cell Quest Software".

7. ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DA INTERAÇÃO DAS LECTINAS DE *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus* AOS NEUTRÓFILOS HUMANOS.

No estudo com neutrófilos humanos em citômetro de fluxo, as lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*, mostraram ligarem-se significativamente aos neutrófilos. Sendo *Pisum arvense* a lectina que mostrou maior interação a tais células, e da mesma forma que macrófagos e mastócitos de ratos, as interações dessas lectinas às células mostraram-se diferentes de acordo com a lectina. No controle da viabilidade celular pela marcação das células por Iodeto de propídio, todas as culturas celulares apresentaram-se viáveis, após a incubação com as lectinas (**Figuras 47, 48, 49, 50 e Tabela 4**).

Na **figura 46** observamos que foi a lectina de *Pisum arvense* que apresentou maior interação aos neutrófilos humanos, 792% de aumento da intensidade de fluorescência, emitida pelas células em PBS (auto-fluorescência), seguida pelas lectinas de *Helianthus tuberosus* (243%), e ambas, *Arum maculatum* (213%) e *Bauhinia variegata* (213%) mostraram-se idênticas.

A análise dos histogramas da intensidade de fluorescência, nos mostra que as lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*, todas na concentração de 20µg, marcadas com FITC, ligam-se aos neutrófilos humanos significativamente, apresentando picos do histograma de 25, 8, 8 e 10, respectivamente, e média geométrica das intensidades de fluorescência emitida pelo complexo lectina/célula, iguais a 32.30, 11.67, 11.67, 12.90 (unidades

arbitrárias). Os neutrófilos em PBS emitiram uma auto-fluorescência de pico igual a 4, e média geométrica da intensidade de fluorescência variando entre 3.62 à 3.72 (Figuras 47, 48, 49, 50 e Tabela 4).

TABELA 4. ANÁLISE DA INTERAÇÃO DAS LECTINAS DE *Pisum arvense*, *Bauhinia Variiegta*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*, MARCADAS COM FITC, AOS NEUTRÓFILOS HUMANOS.

Amostras		Média geométrica da intensidade de Fluorescência (UA)	Pico do histograma da intensidade de Fluorescência	% de células vivas
Grupo PAL	Controle	3.62	4	99.98
	BSA/FITC	3.94	4	99.99
	PAL/FITC	32.30*	25	98.40
Grupo BVL	Controle	3.72	4	99.84
	BSA/FITC	4.94	4	99.92
	BVL/FITC	11.67*	8	99.52
Grupo AMA	Controle	3.72	4	99.84
	BSA/FITC	4.94	4	99.92
	AMA/FITC	11.67*	8	99.04
Grupo HTA	Controle	3.72	4	99.98
	BSA/FITC	4.92	4	99.99
	HTA/FITC	12.90*	10	99.74

"UA: Unidades Arbitrárias;

5.000 células foram analisadas pelo programa "Cell Quest Software" *p<0.001 em relação ao controle, usando o teste Kolmogorov-Smirnoff.

O pico do histograma é calculado pelo próprio programa.

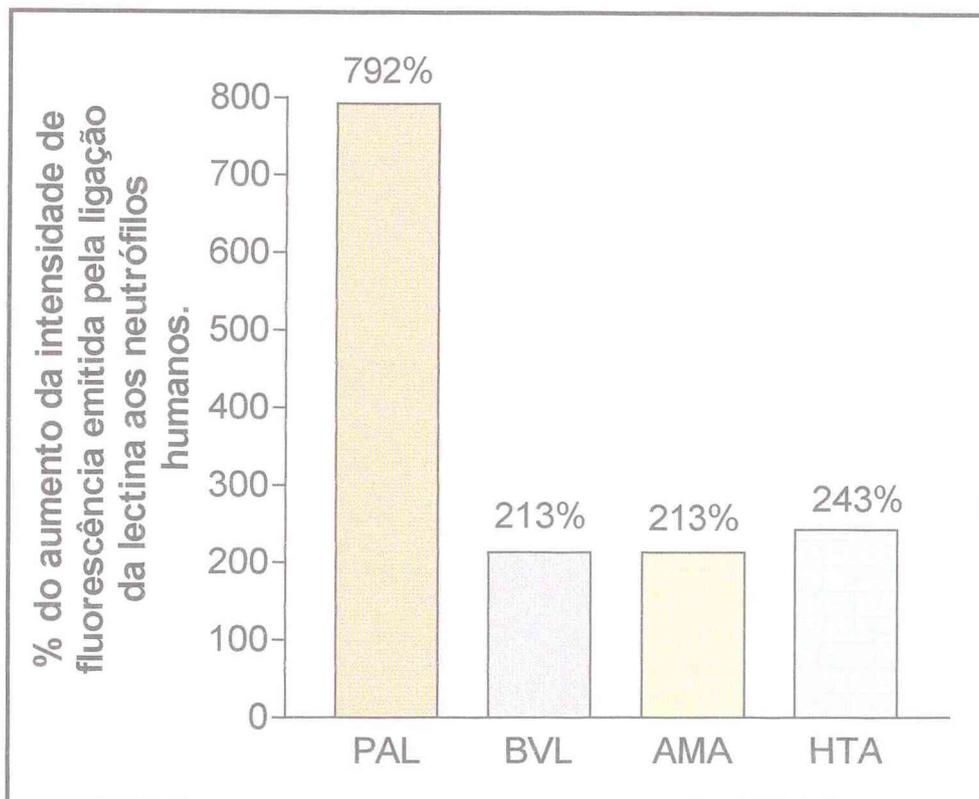


Figura 46: Porcentagem do aumento da Intensidade de Fluorescência emitida por neutrófilos humanos incubados com as lectinas *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*. As barras representam as porcentagens do aumento das intensidades de fluorescência emitidas por neutrófilos incubados com as lectinas PAL, BVL, AMA e HTA, marcadas com FITC, em relação ao controle (auto-fluorescência dos neutrófilos) de cada lectina individualmente (controles não mostrados, equivalentes a zero no gráfico).

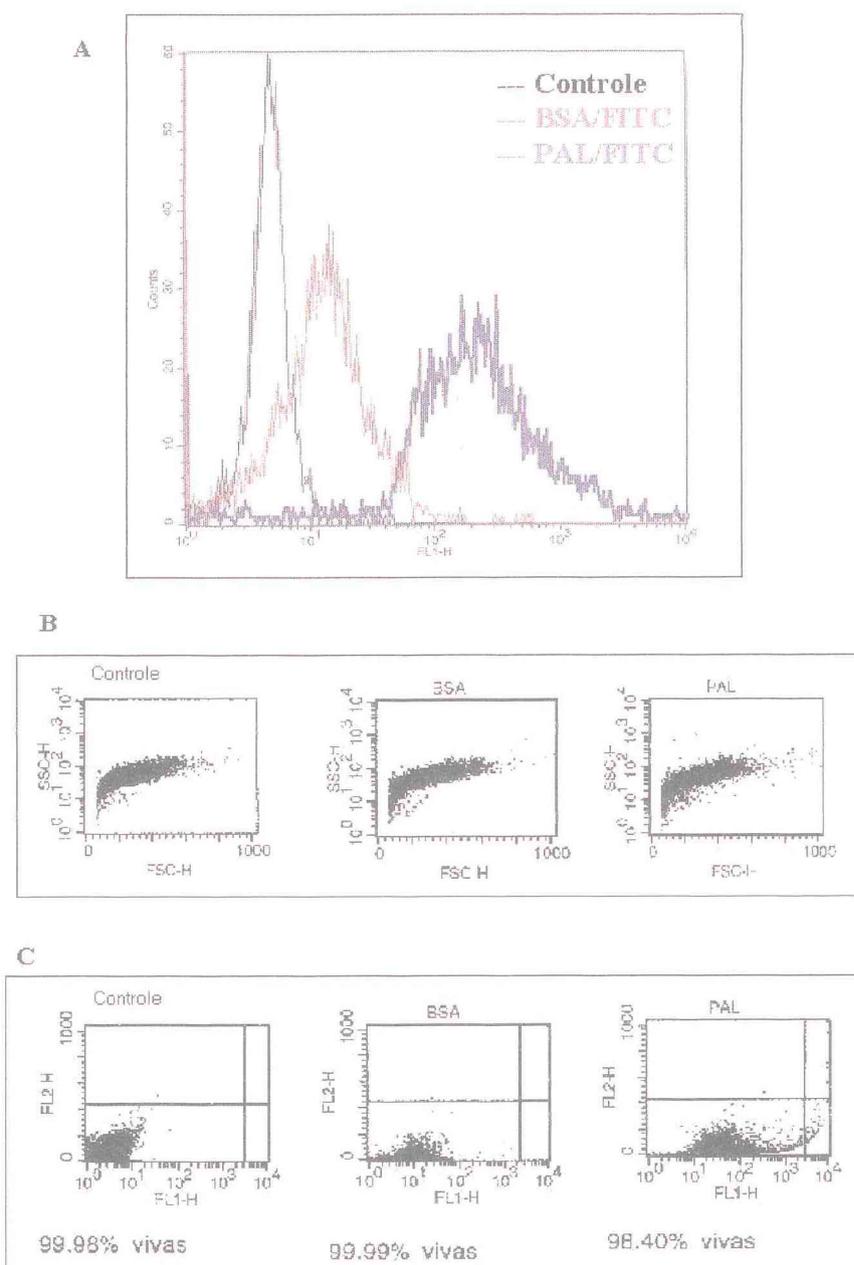


Figura 47: Interação da lectina de *Pisum arvense* marcada com FITC à neutrófilos humanos. Em **A** e **B**, neutrófilos humanos (10^6 células) foram incubados durante 30min a 4°C com PBS (controle), ou BSA/FITC ($20\mu\text{g}$), ou PAL/FITC($20\mu\text{g}$). Os neutrófilos foram lavados, ressuspensos em PBS ($400\mu\text{L}$) e a intensidade de fluorescência (luz verde FL-1) emitida por 5.000 células de cada amostra foi mensurada. Em **C**, as amostras foram incubadas por mais 10min com $10\mu\text{L}$ de lodado de propídio, e a viabilidade celular foi avaliada mensurando-se a intensidade de fluorescência (luz vermelha - FL2) emitida também por 5.000 células de cada amostra. Em **A**, mostramos o histograma da intensidade de fluorescência (FL1-1); em **B**, as populações dos neutrófilos mensurados em relação ao tamanho (FSC-H) e a granulação (SSC-H); e em **C**, a viabilidade celular expressa por porcentagem de células vivas. Os dados foram analisados pelo programa "Cell Quest Software".

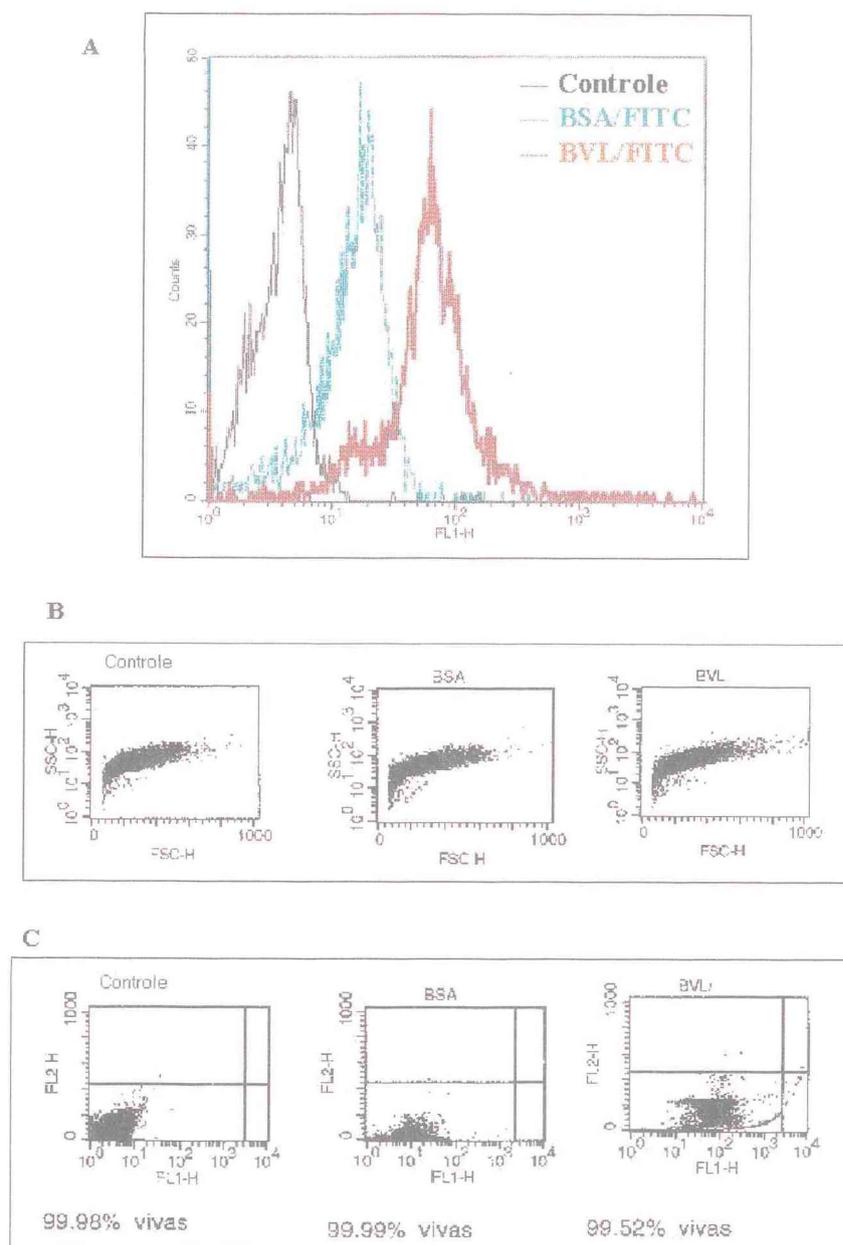


Figura 48: Interação da lectina de *Bauhinia variegata* marcada com FITC à neutrófilos humanos. Em **A** e **B**, neutrófilos humanos (10^6 células) foram incubados durante 30min a 4°C com PBS (controle), ou BSA/FITC ($20\mu\text{g}$), ou BVL/FITC($20\mu\text{g}$). Os neutrófilos foram lavados, ressuspensos em PBS ($400\mu\text{L}$) e a intensidade de fluorescência (luz verde FL-1) emitida por 5.000 células de cada amostra foi mensurada. Em **C**, as amostras foram incubadas por mais 10min com $10\mu\text{L}$ de iodado de propídio, e a viabilidade celular foi avaliada mensurando-se a intensidade de fluorescência (luz vermelha - FL2) emitida também por 5.000 células de cada amostra. Em **A**, mostramos o histograma da intensidade de fluorescência (FL1-1); em **B**, as populações dos neutrófilos mensurados em relação ao tamanho (FSC-H) e a granulação (SSC-H); e em **C**, a viabilidade celular expressa por porcentagem de células vivas. Os dados foram analisados pelo programa "Cell Quest Software".

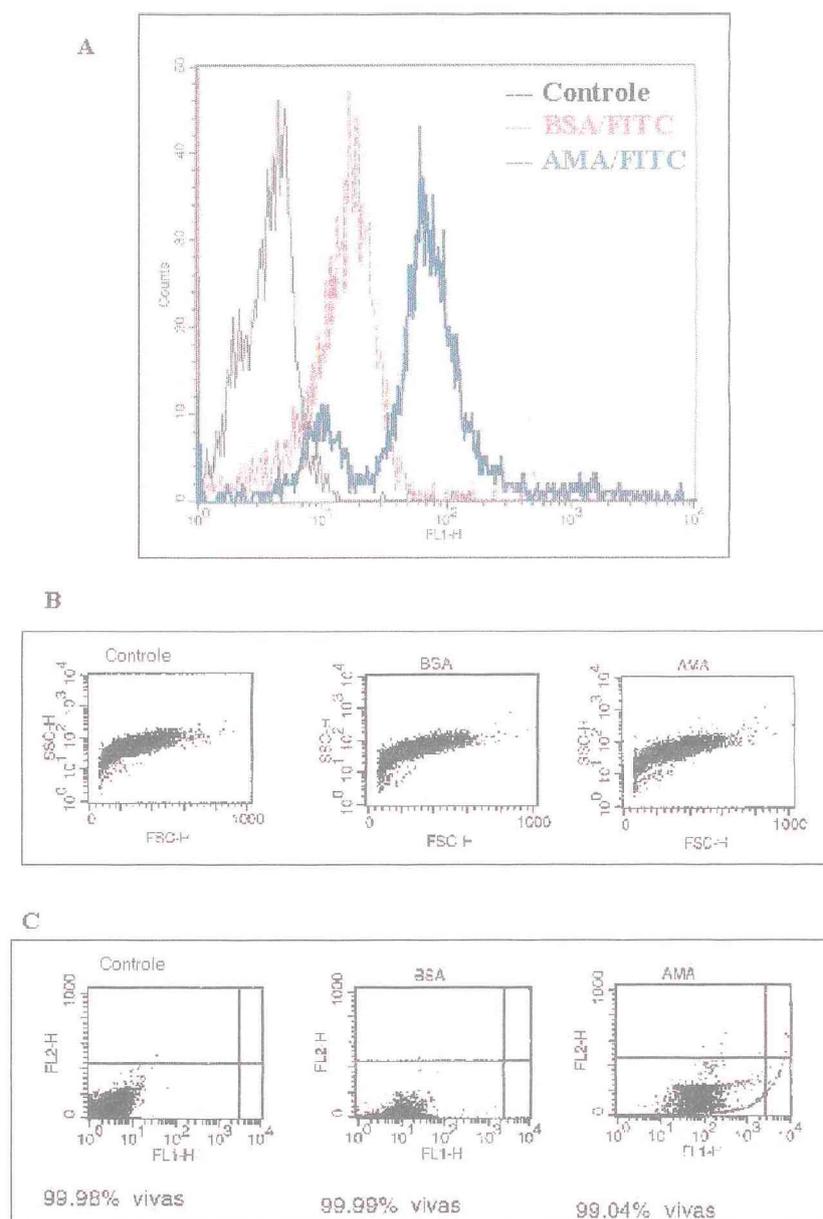


Figura 49: Interação da lectina de *Arum maculatum* marcada com FITC à neutrófilos humanos. Em **A** e **B**, neutrófilos humanos (10^6 células) foram incubados durante 30min a 4°C com PBS (controle), ou BSA/FITC ($20\mu\text{g}$), ou AMA/FITC($20\mu\text{g}$). Os neutrófilos foram lavados, ressuspensos em PBS ($400\mu\text{L}$) e a intensidade de fluorescência (luz verde FL-1) emitida por 5.000 células de cada amostra foi mensurada. Em **C**, as amostras foram incubadas por mais 10min com $10\mu\text{L}$ de iodeto de propídio, e a viabilidade celular foi avaliada mensurando-se a intensidade de fluorescência (luz vermelha - FL2) emitida também por 5.000 células de cada amostra. Em **A**, mostramos o histograma da intensidade de fluorescência (FL1-1); em **B**, as populações dos neutrófilos mensurados em relação ao tamanho (FSC-H) e a granulação (SSC-H); e em **C**, a viabilidade celular expressa por porcentagem de células vivas. Os dados foram analisados pelo programa "Cell Quest Software".

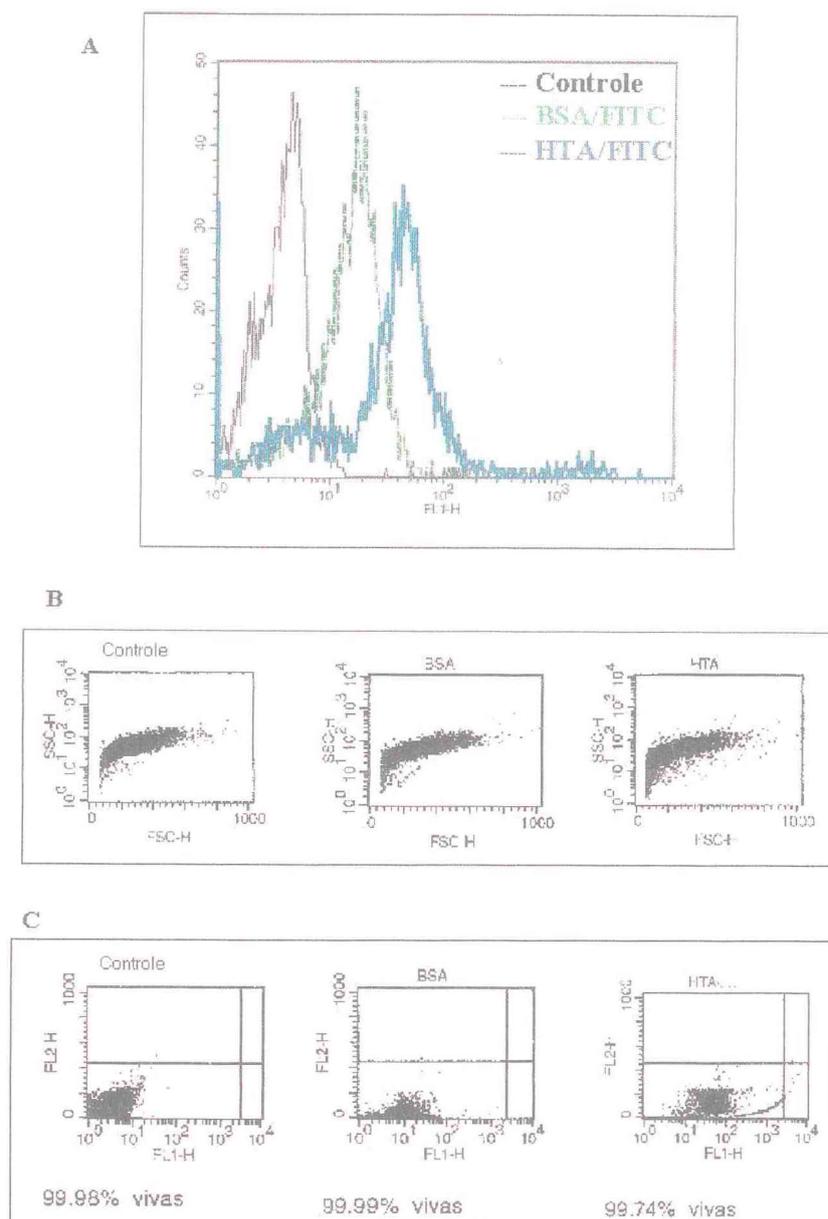


Figura 50: Interação da lectina de *Helianthus tuberosus* marcada com FITC à neutrófilos humanos. Em **A** e **B**, neutrófilos humanos (10^6 células) foram incubados durante 30min a 4°C com PBS (controle), ou BSA/FITC ($20\mu\text{g}$), ou HTA/FITC($20\mu\text{g}$). Os neutrófilos foram lavados, ressuspensos em PBS ($400\mu\text{L}$) e a intensidade de fluorescência (luz verde FL-1) emitida por 5.000 células de cada amostra foi mensurada. Em **C**, as amostras foram incubadas por mais 10min com $10\mu\text{L}$ de iodado de propídio, e a viabilidade celular foi avaliada mensurando-se a intensidade de fluorescência (luz vermelha - FL2) emitida também por 5.000 células de cada amostra. Em **A**, mostramos o histograma da intensidade de fluorescência (FL1-1); em **B**, as populações dos neutrófilos mensurados em relação ao tamanho (FSC-H) e a granulação (SSC-H); e em **C**, a viabilidade celular expressa por porcentagem de células vivas. Os dados foram analisados pelo programa "Cell Quest Software".

8. ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DA INTERAÇÃO DAS LECTINAS DE *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus* A MONÓCITOS HUMANOS DERIVADOS DA LINHAGEM CELULAR HL60.

No estudo com "monócitos humanos" em citômetro de fluxo, as lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*, mostraram ligarem-se significativamente as células. A interação das lectinas foi diferente de acordo com a lectina, sendo que *Helianthus tuberosus* foi a lectina que mostrou menor interação aos "monócitos humanos". No controle da viabilidade celular pela marcação das células por Iodeto de propídio, todas as culturas celulares apresentaram-se viáveis, após a incubação com as referidas lectinas (**Figuras 52, 53, 54, 44 e Tabela 5**).

Na **figura 51** observamos que foi *Arum maculatum* e *Pisum arvense* as lectinas que apresentaram maior interação aos "monócitos humanos", 486 e 453% respectivamente, de aumento da intensidade de fluorescência emitida pelos monocitos em PBS, seguidas por *Bauhinia variegata* (281) e *Helianthus tuberosus* (94%), que semelhante a interação com macrófagos de ratos, foi a lectina de ligou-se mais fracamente.

A análise dos histogramas da intensidade de fluorescência, mostra que as lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*, todas na concentração de 20µg, marcadas com FITC, ligam-se aos monócitos humanos significativamente, apresentando picos do histograma de 10, 7, 15 e 3, respectivamente, e média geométrica das intensidades de fluorescência emitida pelo complexo lectina/célula, iguais a 14.50, 9.99, 15.25, e 5.08 (unidades arbitrárias). Os monócitos em PBS emitiram uma auto-fluorescência de pico igual a

2, e média geométrica da intensidade de fluorescência variando entre 2.62 à 2.80 (Figuras 52, 53, 54, 55 e Tabela 5).

TABELA 5. ANÁLISE DA INTERAÇÃO DAS LECTINAS DE *Pisum arvense*, *Bauhinia Variiegta*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*, MARCADAS COM FITC, AOS MONÓCITOS HUMANOS.

Amostras		Média geométrica da intensidade de Fluorescência (UA)	Pico do histograma da intensidade de Fluorescência	% de células vivas
Grupo PAL	Controle	2.62	2	99.98
	BSA/FITC	2.72	2	99.96
	PAL/FITC	14.50*	10	99.70
Grupo BVL	Controle	2.62	2	99.98
	BSA/FITC	2.72	2	99.96
	BVL/FITC	9.99*	7	99.82
Grupo AMA	Controle	2.60	1	99.98
	BSA/FITC	3.54	3	99.82
	AMA/FITC	15.25*	15	99.78
Grupo HTA	Controle	2.62	2	99.98
	BSA/FITC	2.72	2	99.96
	HTA/FITC	5.06*	3	99.16

"UA: Unidades Arbitrárias;

5.000 células foram analisadas pelo programa "Cell Quest Software" *p<0.001 em relação ao controle, usando o teste Kolmogorov-Smirnoff.

O pico do histograma é calculado pelo próprio programa.

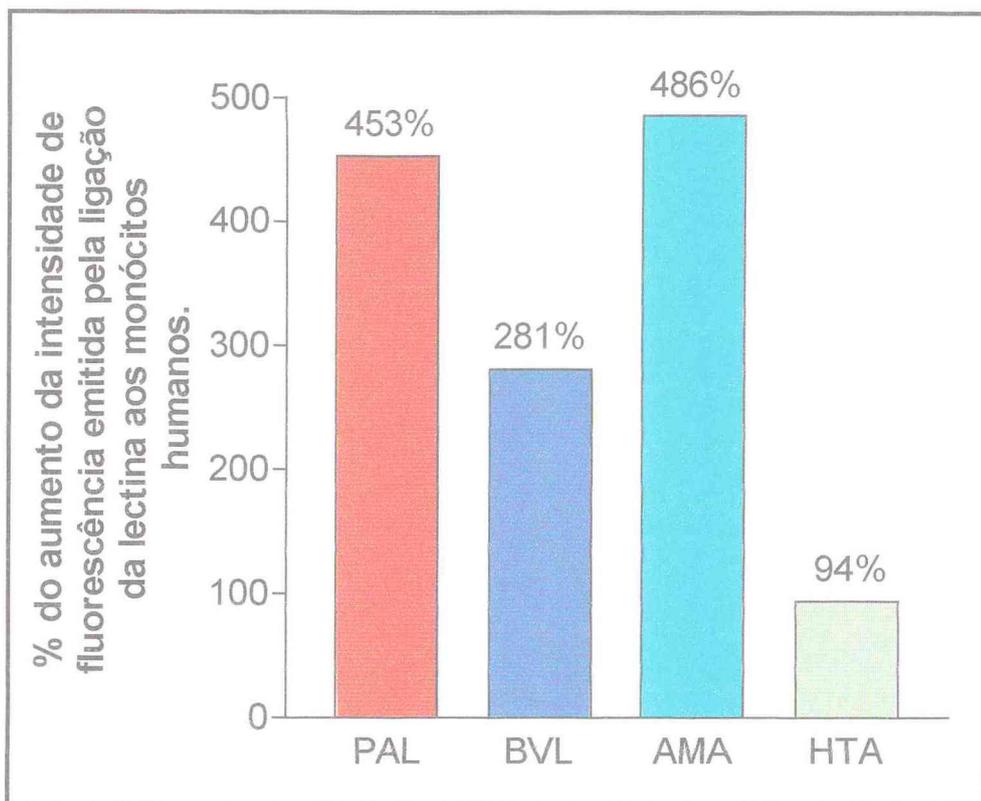


Figura 51: Porcentagem do aumento da Intensidade de Fluorescência emitida por monócitos humanos derivados da linhagem celular HL60, incubados com as lectinas *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus*. As barras representam as porcentagens do aumento das intensidades de fluorescência emitidas por monócitos incubados com as lectinas PAL, BVL, AMA e HTA, marcadas com FITC, em relação ao controle (auto-fluorescência dos neutrófilos) de cada lectina individualmente (controles não mostrados, equivalentes a zero no gráfico).

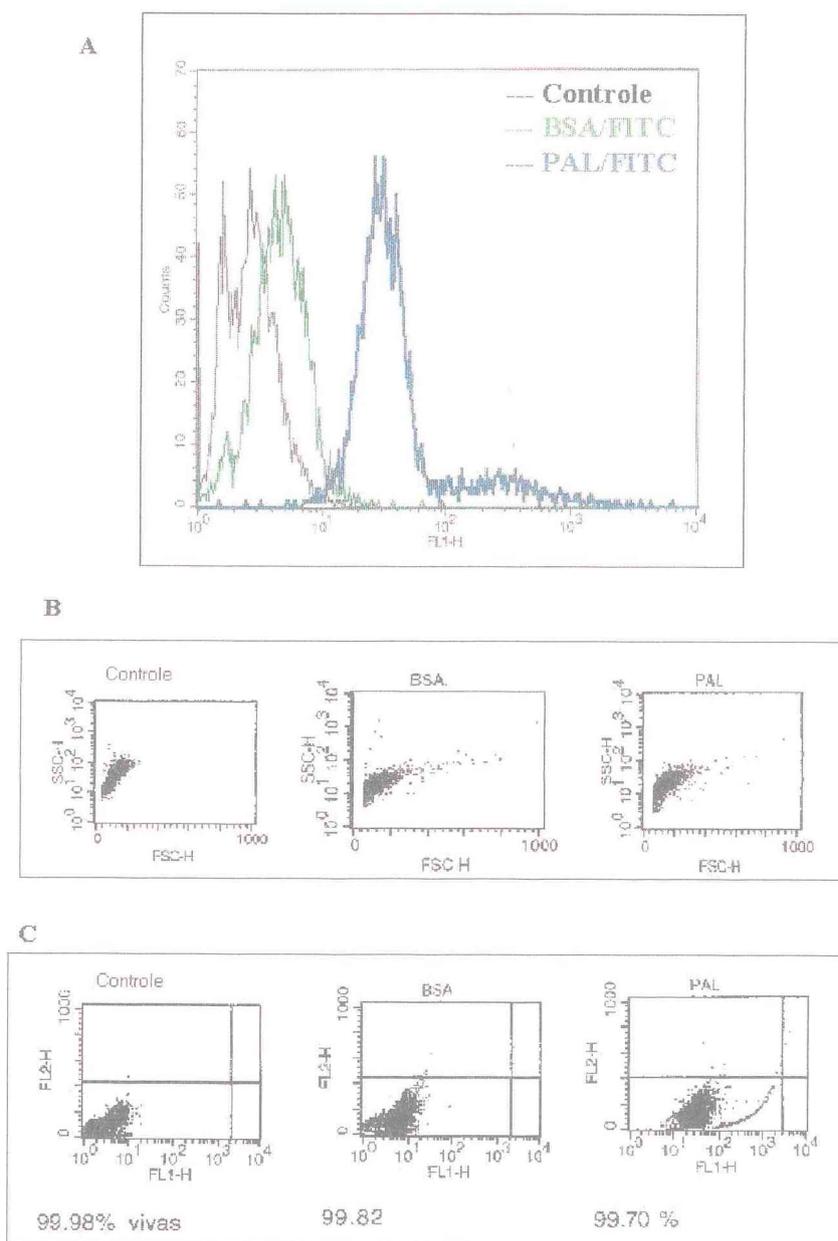


Figura 52: Interação da lectina de *Pisum arvense* marcada com FITC à monócitos derivados da linhagem celular humana HL60. Em A e B, monócitos humanos (10^6 células) foram incubados durante 30min a 4°C com PBS (controle), ou BSA/FITC ($20\mu\text{g}$), ou PAL/FITC($20\mu\text{g}$). Os monócitos foram lavados, ressuspensos em PBS ($400\mu\text{L}$) e a intensidade de fluorescência (luz verde FL-1) emitida por 5.000 células de cada amostra foi mensurada. Em C, as amostras foram incubadas por mais 10min com $10\mu\text{L}$ de Iodido de propídio, e a viabilidade celular foi avaliada mensurando-se a intensidade de fluorescência (luz vermelha - FL2) emitida também por 5.000 células de cada amostra. Em A, mostramos o histograma da intensidade de fluorescência (FL1-1); em B, as populações dos monócitos mensurados em relação ao tamanho (FSC-H) e a granulação (SSC-H); e em C, a viabilidade celular expressa por porcentagem de células vivas. Os dados foram analisados pelo programa "Cell Quest Software".

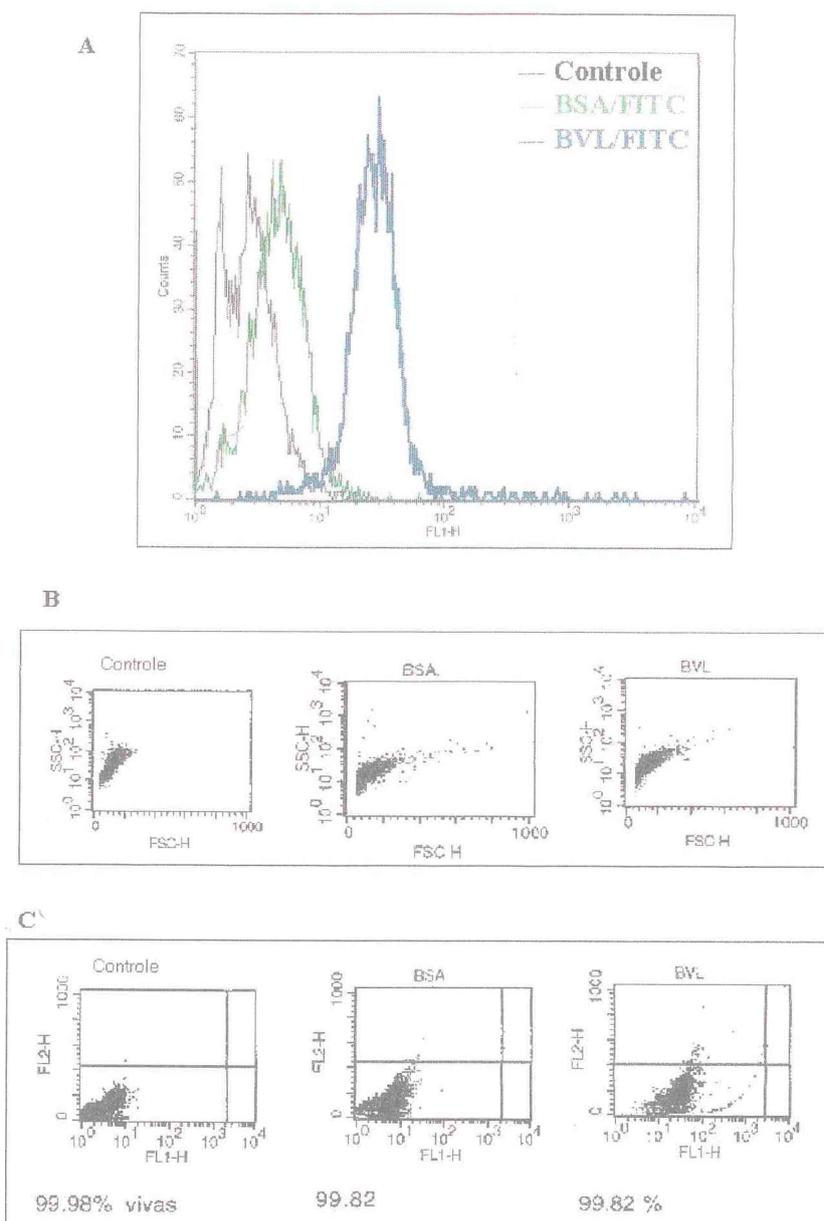


Figura 53: Interação da lectina de *Bauhinia variegata* marcada com FITC à monócitos derivados da linhagem celular humana HL60. Em **A** e **B**, monócitos humanos (10^6 células) foram incubados durante 30min a 4°C com PBS (controle), ou BSA/FITC ($20\mu\text{g}$), ou BVL/FITC($20\mu\text{g}$). Os monócitos foram lavados, ressuspensos em PBS ($400\mu\text{L}$) e a intensidade de fluorescência (luz verde FL-1) emitida por 5.000 células de cada amostra foi mensurada. Em **C**, as amostras foram incubadas por mais 10min com $10\mu\text{L}$ de Iodeto de propídio, e a viabilidade celular foi avaliada mensurando-se a intensidade de fluorescência (luz vermelha - FL2) emitida também por 5.000 células de cada amostra. Em **A**, mostramos o histograma da intensidade de fluorescência (FL1-1); em **B**, as populações dos monócitos mensurados em relação ao tamanho (FSC-H) e a granulação (SSC-H); e em **C**, a viabilidade celular expressa por porcentagem de células vivas. Os dados foram analisados pelo programa "Cell Quest Software".

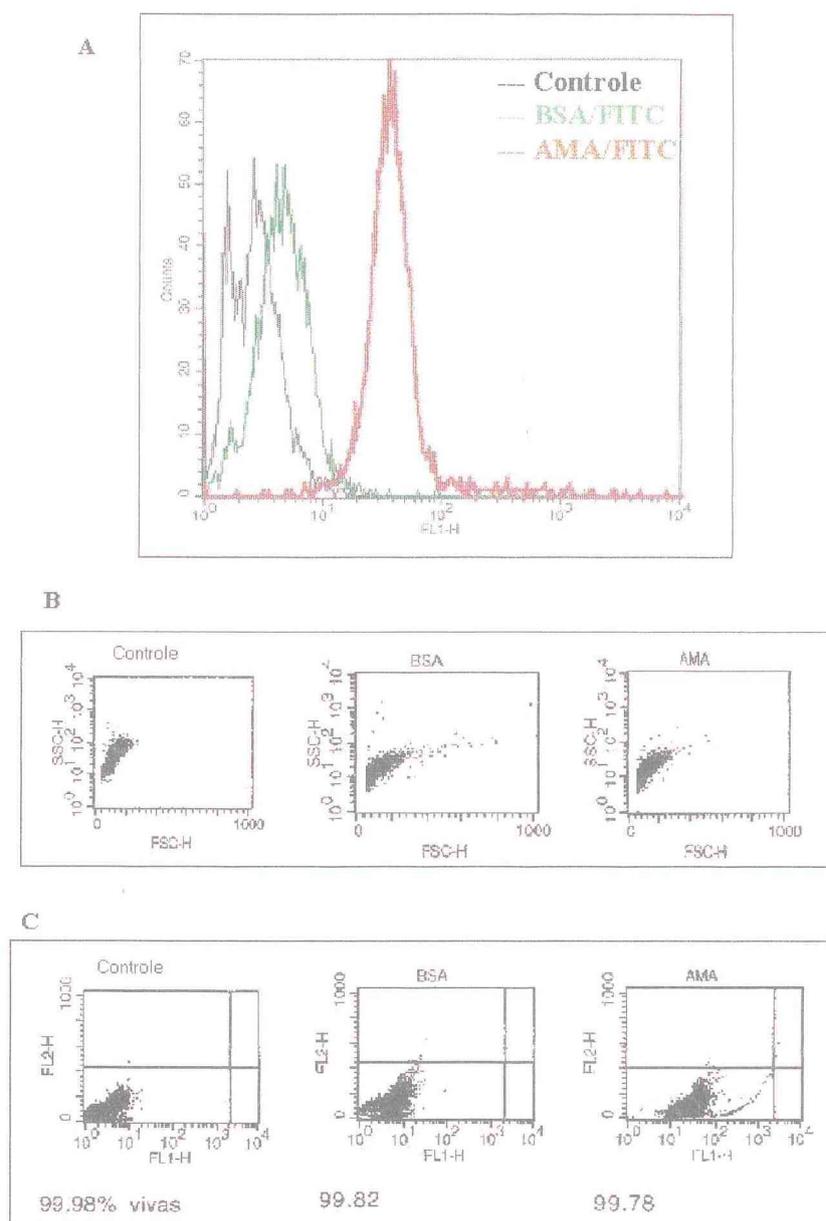


Figura 54: Interação da lectina de *Arum maculatum* marcada com FITC à monócitos derivados da linhagem celular humana HL60. Em **A** e **B**, monócitos humanos (10^6 células) foram incubados durante 30min a 4°C com PBS (controle), ou BSA/FITC ($20\mu\text{g}$), ou AMA/FITC($20\mu\text{g}$). Os monócitos foram lavados, ressuspensos em PBS ($400\mu\text{L}$) e a intensidade de fluorescência (luz verde FL-1) emitida por 5.000 células de cada amostra foi mensurada. Em **C**, as amostras foram incubadas por mais 10min com $10\mu\text{L}$ de Iodeto de propídio, e a viabilidade celular foi avaliada mensurando-se a intensidade de fluorescência (luz vermelha - FL2) emitida também por 5.000 células de cada amostra. Em **A**, mostramos o histograma da intensidade de fluorescência (FL1-1); em **B**, as populações dos monócitos mensurados em relação ao tamanho (FSC-H) e a granulação (SSC-H); e em **C**, a viabilidade celular expressa por porcentagem de células vivas. Os dados foram analisados pelo programa "Cell Quest Software".

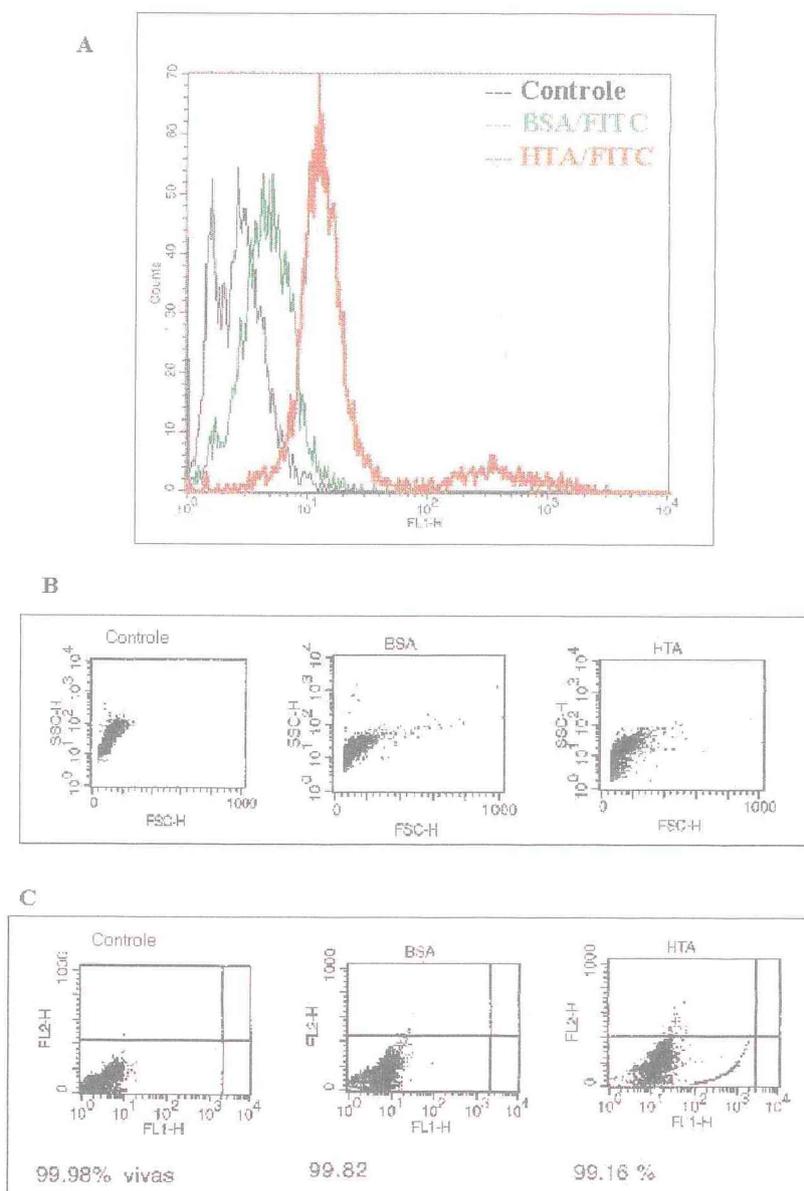


Figura 55: Interação da lectina de *Helianthus tuberosus* marcada com FITC à monócitos derivados da linhagem celular humana HL60. Em **A** e **B**, monócitos humanos (10^6 células) foram incubados durante 30min a 4°C com PBS (controle), ou BSA/FITC ($20\mu\text{g}$), ou HTA/FITC($20\mu\text{g}$). Os monócitos foram lavados, ressuspensos em PBS ($400\mu\text{L}$) e a intensidade de fluorescência (luz verde FL-1) emitida por 5.000 células de cada amostra foi mensurada. Em **C**, as amostras foram incubadas por mais 10min com $10\mu\text{L}$ de Iodeto de propídio, e a viabilidade celular foi avaliada mensurando-se a intensidade de fluorescência (luz vermelha - FL2) emitida também por 5.000 células de cada amostra. Em **A**, mostramos o histograma da intensidade de fluorescência (FL1-1); em **B**, as populações dos monócitos mensurados em relação ao tamanho (FSC-H) e a granulação (SSC-H); e em **C**, a viabilidade celular expressa por porcentagem de células vivas. Os dados foram analisados pelo programa "Cell Quest Software".

9. ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO DA INTERAÇÃO DAS LECTINAS DE *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* E *Helianthus tuberosus* À MASTÓCITOS OU MACRÓFAGOS DE RATOS PRÉ-INCUBADOS COM O SOBRENADANTE DE CULTURAS DE MACRÓFAGOS PRÉ-ESTIMULADAS COM AS MESMAS LECTINAS.

Na **tabela 6** nos mostra que interação das lectinas de *Pisum arvense* (20µg) e *Arum maculatum* (20µg), marcadas com FITC, à macrófagos de ratos pré-incubados com o sobrenadante de culturas de macrófagos estimulados com as mesmas lectinas na concentração de 300µg/mL, aumentou significativamente, quando comparadas ao mesmo ensaio com macrófagos normais, sem prévia incubação. No entanto a interação das lectinas de *Bauhinia variegata* (20µg) e *Helianthus tuberosus* (20µg), aos mesmos macrófagos de ratos pré-incubados com o sobrenadante das culturas de macrófagos estimulados com as mesmas lectinas, ou seja, BVL e HTA , também nas concentração de 300µg/mL, não foi alterada quando comparada a citometria com os macrófagos normais.

Em experimento similar, realizado com mastócitos de ratos, nos mostrou que a interação das lectinas de *Bauhinia variegata* (20µg) e *Arum maculatum* (20µg), marcadas com FITC, aos mastócitos de ratos pré-incubados com o sobrenadante de culturas de macrófagos estimulados com as mesmas lectinas, na concentração de 300µg/mL, aumentou significativamente, quando comparadas ao mesmo ensaio com mastócitos normais. No entanto a interação das lectinas de *Pisum arvense* (20µg) e *Helianthus tuberosus* (20µg), aos mastócitos de ratos pré-incubados com o sobrenadante das culturas de macrófagos estimulados com as estas lectinas, na

concentração de 300µg/mL, não foi alterada quando comparada à citometria com os mastócitos normais.

TABELA 6. COMPARAÇÃO DA INTERAÇÃO DAS LECTINAS PAL(20µg), BVL(20µg), AMA(20µg) e HTA(20µg), MARCADAS COM FITC, A MACRÓFAGOS DE RATOS PRÉ-INCUBADOS COM O SOBRENADANTE DE CULTURAS DE MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM AS MESMAS LECTINAS.

Amostra	Controle	BSA/FITC	Macrófagos normais	Macrófagos pré-estimulado com sobrenadante de MOs
PAL/FITC	2.34	2.76	8.16	10.49*
BVL/FITC	2.34	2.76	10.37	10.49
AMA/FITC	2.34	2.76	8.57	11.71*
HTA/FITC	2.34	2.76	5.32	5.28

MOs: cultura de macrófagos pré-estimulado com lectinas

Os valores expressam a média geométrica da intensidade de fluorescência (Unidades Arbitrárias);

5.000 células foram analisadas pelo programa "Cell Quest Software" *p<0.001 em relação ao controle, usando o teste Kolmogorov-Smirnoff.

TABELA 7. COMPARAÇÃO DA INTERAÇÃO DAS LECTINAS PAL(20µg), BVL(20µg), AMA(20µg) e HTA(20µg), MARCADAS COM FITC, A MASTÓCITOS DE RATOS PRÉ-INCUBADOS COM O SOBRENADANTE DE CULTURAS DE MACRÓFAGOS ESTIMULADOS COM AS MESMAS LECTINAS.

Amostra	Controle	BSA/FITC	Mastócitos normais	Mastócitos pré-estimulado com sobrenadante de MOs
PAL/FITC	1.85	1.95	12.60	11.99
BVL/FITC	1.85	1.95	17.10	22.64*
AMA/FITC	1.85	1.95	14.89	18.40*
HTA/FITC	1.85	1.95	15.19	14.19

MOs: cultura de macrófagos pré-estimulado com lectinas

Os valores expressam a média geométrica da intensidade de fluorescência (Unidades Arbitrárias);

3.000 células foram analisadas pelo programa "Cell Quest Software" *p<0.001 em relação ao controle, usando o teste Kolmogorov-Smirnoff.

IV. DISCUSSÃO

IV – DISCUSSÃO

No presente estudo, investigamos a atividade pró-inflamatória das lectinas de *Pisum arvense*, *Bauhinia variegata*, *Arum maculatum* e *Helianthus tuberosus* em neutrófilos, o papel das células residentes peritoneais, bem como a intensidade de interação das lectinas aos macrófagos/monócitos, mastócitos e neutrófilos.

Vários dados da literatura com lectinas vegetais, tem demonstrado que lectinas possuem capacidade de estimular a proliferação de linfócitos murinos e humanos, estimular macrófagos e mastócitos, induzir migração de neutrófilos, além de apresentarem também, quando administrada endovenosamente, propriedades antiinflamatória (Gebauer *et al.*, 1982; Frier & Rudiger, 1990; Barral-Netto *et al.*, 1992; Rodriguez *et al.*, 1992; Gomes *et al.*, 1994; Ferreira *et al.*, 1996; Assreuy *et al.*, 1997; Andrade *et al.*, 1999; Alencar *et al.*, 1999; Assreuy *et al.*, 1999; Bento *et al.*, 2001; Assreuy *et al.*, 2002; Alencar *et al.*, 2002).

Nossos dados obtidos após as várias etapas de experiências, nos mostram claramente que estas lectinas possuem atividade pró-inflamatória, mas que embora três destas lectinas sejam ligadoras de manose, elas induzem migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal por mecanismos diferentes, além de apresentarem diferentes graus de interação às células. As quatro lectinas não apresentaram toxicidade para as células estudadas, nas doses utilizadas.

Dessa maneira, analisando cada lectina individualmente, vemos que, a lectina de *Pisum arvense*, é uma lectina pro-inflamatória, pois foi capaz, nos experimentos *in vivo*, de induzir migração de neutrófilos, bem como *in vitro*. Entretanto, na investigação da participação das células residentes no processo de indução da migração de neutrófilos, encontramos resultados surpreendentes. Como vimos, nos

experimentos de lavagem da cavidade peritoneal dos ratos com salina, procedimento este que depletou as células residentes em cerca de 80%, a lectina de *Pisum arvense* continuou a induzir migração semelhante à migração induzida por esta lectina nos grupos que não foram lavados, embora a migração de neutrófilos tenha sido potenciada no momento em que aumentamos a população de macrófagos pelo tratamento com tioglicolato. A este respeito, podemos sugerir, que a lectina de *Pisum arvense*, além de poder estar induzindo a migração de neutrófilos diretamente, poderia também ter um forte efeito sobre os 20% de células residentes restantes após a lavagem, neste caso, macrófagos, o que seria capaz de induzir uma migração de neutrófilos similar aos grupos não lavados.

Esta lectina também se mostrou capaz de estimular macrófagos a produzirem, possivelmente, fatores quimiotáticos, que induziriam a migração de neutrófilos, ou ainda, citocinas que estimulariam as células residentes a induzirem a migração, fato este demonstrado pela injeção do sobrenadante de uma cultura de macrófagos estimulados com a lectina de *Pisum arvense*, na cavidade peritoneal de ratos. Este resultado foi similar a injeção do sobrenadante de uma outra cultura de macrófagos incubados com LPS (lipopolissacarídeo bacteriano, classicamente conhecido como estimulador de macrófagos). Corroborando com estes dados, Andrade e colaboradores, 1999, demonstraram *in vitro*, que a lectina de *Pisum arvense* estimula macrófagos, e induzem a produção de óxido nítrico.

O tratamento com o composto 48/80, o qual depletou cerca de 92% dos mastócitos da cavidade peritoneal dos ratos, potenciou a migração de neutrófilos estimulada pela lectina de *Pisum arvense*, dado este que nos leva a crer que esta lectina estaria, possivelmente, estimulando mastócitos a liberarem fatores que modulariam a migração de neutrófilos.

Na investigação da ligação da lectina às células estudadas, vimos que *Pisum arvense*, que é uma lectina que se liga à glicose-manose, marcada com FITC e que incubada com macrófagos de ratos, foi capaz de emitir uma fluorescência 238% maior que a intensidade de fluorescência normal emitida por estas células; que no mesmo procedimento realizado com monócitos humanos derivados da linhagem HL60, esta lectina emitiu uma fluorescência de 453% maior que a fluorescência emitida pelos monócitos controle; que incubando-se esta lectina com mastócitos de ratos, a emissão de fluorescência foi 363% maior que os mastócitos controle; e ainda, emitiu uma fluorescência 792%, quando incubada com neutrófilos humanos, maior que a fluorescência emitida por neutrófilos humanos controle.

Baseado nos dados obtidos nos experimentos de indução da migração de neutrófilos e de interação às células do sistema imune, poderíamos inferir que a lectina de *Pisum arvense*, possui alta afinidade por neutrófilos, ligando-se também fortemente aos macrófagos/monócitos e mastócitos (792, 238/453 e 363% de aumento de intensidade de fluorescência), e que estas interações, permitiriam a lectina de modificar e estimular macrófagos, mastócitos e neutrófilos. Assim, hipoteticamente, a lectina PAL estaria exercendo seus efeitos pró-inflamatórios de maneira direta (agindo sobre neutrófilos) e indireta (mediado por macrófagos), além de induzir uma modulação da migração mediada por mastócitos.

A lectina *Arum maculatum*, também uma lectina glicose-manose, mostrou nos experimentos de migração também ser pró-inflamatória, diferindo, no entanto, em alguns aspectos, dos mecanismos supostos para a lectina de *Pisum arvense*. Como foi visto, a injeção de *Arum maculatum* na cavidade peritoneal de ratos, induz migração de neutrófilos, e ao depletarmos as células residentes pela lavagem da cavidade peritoneal com salina, a migração de neutrófilos não foi alterada,

similarmente a *Pisum arvense*. Este fato possivelmente deve-se também, a indução da migração de neutrófilos de maneira direta (agindo sobre neutrófilos), somado ao fato de que os macrófagos residentes restantes, após lavagem das cavidades, estariam também ativamente induzindo a migração.

Corroborando com esta hipótese, a lectina de *Arum maculatum*, induz migração de neutrófilos *in vitro*, além de que macrófagos também são estimulados por esta lectina, e induzem migração de neutrófilos, como foi demonstrado nos experimentos onde o número de macrófagos foi aumentado pelo tratamento com tioglicolato e no experimento da injeção do sobrenadante de culturas de macrófagos estimulados com a mesma lectina, na cavidade peritoneal dos animais.

Um importante dado visto com a lectina de *Arum maculatum*, é que mastócitos parecem não serem afetados de maneira importante por esta lectina, como nos demonstram os dados, onde após o pré-tratamento dos animais com o composto 48/80, o qual depleta mastócitos, a migração de neutrófilos ficou inalterada, ou seja, parece que AMA não é capaz de sensibilizar ou estimular mastócitos. Este dado difere totalmente do mecanismo de ação da lectina de *Pisum arvense*.

Embora a lectina de *Arum maculatum* seja ligadora de glicose-manose, semelhante a lectina de *Pisum arvense*, as interações aos macrófagos, mastócitos e neutrófilos tiveram intensidades diferentes. Os resultados nos mostram que entre as interações celulares, a lectina AMA ligou-se significativamente aos macrófagos, neutrófilos e mastócitos, mas que, embora a lectina de *Arum maculatum* ligue-se de maneira significativa a mastócitos de ratos (279% de aumento da intensidade de fluorescência), esta lectina parece não induzir alterações sobre os mastócitos, ou

seus efeitos podem estar mascarados pela forte atividade de macrófagos, somado ao efeito direto da lectina sobre neutrófilos.

A terceira lectina estudada que também é glicose-manose, lectina de *Helianthus tuberosus*, demonstrou possuir atividade pró-inflamatória, entretanto por diferentes mecanismos que as lectinas de *Pisum arvense* e *Arum maculatum*. Essa lectina, comparada a todas as outras lectinas, foi a lectina que apresentou menor interação aos macrófagos e monócitos, apresentando, entretanto, interação aos neutrófilos de maneira similar a lectina de *Arum maculatum*. Os dados nos mostram que HTA marcada com FITC, incubada com macrófagos, aumentou 89% da intensidade de fluorescência emitida por macrófagos controle, e aumentou em 94% da intensidade de fluorescência normalmente emitida por monócitos humanos derivados da linhagem de HL60. Estes valores são considerados baixos, quando comparados a interação da lectina de *Pisum arvense* (238% e 453%), *Arum maculatum* (625% e 486%) e *Bauhinea variegata* (479% e 281%) (dados que serão apresentados a seguir).

A interação da lectina de *Helianthus tuberosus* com mastócitos foi significativa, e esta lectina marcada com FITC, incubada com mastócitos de ratos, aumentou a intensidade de fluorescência na ordem de 187% da intensidade emitida pelas células controle. Sobre neutrófilos, o aumento da intensidade de fluorescência foi de 243%, comparado com a fluorescência emitida pelos neutrófilos controle.

Em relação ao mecanismo de ação desta lectina na atividade pró-inflamatória, os dados nos levam a sugerir que esta lectina estaria agindo por mecanismos dependentes e independentes de células residentes, ou seja: dependentemente, esta lectina estaria agindo sobre células residentes, entretanto a resposta inflamatória estaria na verdade, sendo modulada por mastócitos, uma vez que a

lectina de *Helianthus tuberosus* parece não ativar macrófagos, como foi demonstrado nos experimentos com tioglicolato, onde os animais que apresentaram maior número de macrófagos, não alteraram a migração de neutrófilos, e na injeção do sobrenadante de macrófagos estimulados por HTA na cavidade peritoneal de ratos, a qual não foi capaz de induzir migração de neutrófilos; independentemente de células residentes, a lectina induziria migração de neutrófilos diretamente, hipótese que pode ser baseada na capacidade dessa lectina induzir migração de neutrófilos *in vitro*, e na boa afinidade aos neutrófilos (interação que aumentou a intensidade de fluorescência em 243%).

Também foi demonstrado nos experimentos de lavagem da cavidade peritoneal com salina, que a lavagem não alterou os resultados encontrados, comparando-se aos animais não lavados e estimulados com esta mesma lectina. Nesse caso poderíamos interligar as três lectinas ligadoras de glicose e manose, que sobre este aspecto, apresentaram os mesmos resultados, ou seja, continuam induzindo o mesmo índice de migração, apesar da redução da população de células residentes.

Como já descrito, sugerimos que este fato possa estar ocorrendo pelos seus efeitos diretos na migração, ou pela ativação nos macrófagos residuais, nos casos das lectinas de *Pisum arvense* e *Arum maculatum*, mas não podemos utilizar esta hipótese com a lectina de *Helianthus tuberosus*, pois esta parece não ativar macrófagos. Entretanto, poderíamos lançar uma terceira hipótese, onde estas três lectinas poderiam estar agindo sobre células endoteliais, onde de fato, células endoteliais, quando estimuladas expressam moléculas de adesão e IL-8, como tem sido demonstrado por alguns autores (Rang *et al.*, 1996; Kieda, 1998; Swain *et al.*, 2002).

Na investigação da atividade pro-inflamatória da lectina de *Bauhinia variegata*, uma lectina ligadora de lactose-galactose, vimos também que esta lectina é pró-inflamatória, capaz de induzir migração de neutrófilos, quando injetada na cavidade peritoneal de ratos, e também é capaz de induzir migração de neutrófilos de maneira direta, em câmara de Boyden em experimento *in vitro*. Entretanto, diferindo das outras três lectinas, e aqui verificamos a grande diferenças das lectinas glicose-manose PAL, AMA e HTA e esta lectina lactose-galactose, ao depletarmos as células residentes das cavidades peritoneais de ratos, pela lavagem das cavidades com solução salina, procedimento que depletou as células em mais de 80%, a migração de neutrófilos foi reduzida significativamente (após injeção de *Bauhinia variegata*), quando comparada aos grupos que não foram lavados.

Corroborando com estes dados que mostram o papel de células residentes na migração de neutrófilos induzida pela lectina de *Bauhinia variegata*, os grupos pré-tratados com tioglicolato, que receberam a lectina BVL, apresentaram uma maior migração de neutrófilos, quando comparados com os grupos não tratados por tioglicolato. A injeção do sobrenadante de culturas de macrófagos estimulados com a lectina de *Bauhinia variegata*, na cavidade peritoneal de ratos, foi capaz de induzir migração de neutrófilos de maneira significativa e similar aos animais que receberam injeções dos sobrenadantes de culturas de macrófagos estimuladas com LPS. Dessa maneira, a lectina de *Bauhinia variegata* além de ligar-se significativamente aos macrófagos, é capaz de produzir uma resposta inflamatória, provavelmente induzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias.

A injeção de *Bauhinia variegata* em animais pré-tratados com o composto 48/80, com o objetivo de depletar mastócitos da cavidade peritoneal, produziu de maneira semelhante a PAL e HTA, uma maior resposta indutora de migração de

neutrófilos, quando comparados aos grupos estimulados com a lectina, mas não pré-tratados com o composto 48/80.

Nos estudos de interação de *Bauhinia variegata* marcada com FITC às células, obtivemos os seguintes resultados: a interação da lectina BVL aos macrófagos de ratos, foi capaz de emitir uma fluorescência 478% maior que a intensidade de fluorescência normal emitida por estas células. Estes dados nos levam a fazer uma correlação com os resultados de migração de neutrófilos, onde depletando a cavidade peritoneal de ratos com salina, a migração foi reduzida, nos revelando a importante participação de macrófagos na migração de neutrófilos induzida por esta lectina. Entretanto essa lectina mostrou ligar-se significativamente a neutrófilos (213% de aumento de intensidade de fluorescência), mas em uma menor intensidade, quando comparada a sua interação com macrófagos (478% de aumento de intensidade de fluorescência). Em relação aos mastócitos de ratos, a emissão de fluorescência foi relativamente baixa (136% maior que os mastócitos controle), comparada a *Pisum arvense* e *Arum maculatum* (PAL: 363%; AMA: 279%), mas suficiente para provocar alterações nos mastócitos, induzindo-os provavelmente a liberarem substâncias que estariam modulando a resposta de macrófagos, de maneira negativa, e que uma vez eliminados os mastócitos, a migração aumentaria.

Parece controversa a ação das lectinas *Pisum arvense*, *Helianthus tuberosus* e *Bauhinia variegata* sobre mastócitos, onde esperaríamos que, após a depleção destas células pelo composto 48/80, tivéssemos reduzido a indução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos, uma vez que mastócitos estimulados são produtores de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , MIP-1, IL-8/CINC-1 além de leucotrienos (LTB₄, LTC₄), prostaglandina (PGD₂), e superóxidos (O₂⁻) (Banks &

Coleman, 1996; Biedermann *et al.*, 2000; Wakahara *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2002). Entretanto, estas células são produtoras de IL-4, IL-13 (Fukuishi *et al.*, 1997; Wakahara *et al.*, 2001) que são citocinas anti-inflamatórias, e que poderiam estar limitando a indução da migração de neutrófilos, agindo sobre macrófagos, células endoteliais e diretamente sobre neutrófilos, inibindo a produção de moléculas de adesão, além de varias citocinas, via bloqueio de NF-kB (Barnes and Adcock, 1997). Neste contexto, em nosso laboratório, Assreuy (2000), sua tese de doutorado, demonstrou, usando lectinas suínas, que estas lectinas estariam estimulando mastócitos a liberarem IL-4, modulando assim a migração de neutrófilos induzida por esta lectina, além de que Vale e colaboradores (2002), demonstraram as propriedades antiinflamatórias das lectinas IL-4, IL-10 e IL-13, em teste de nocicepção.

Vários outros autores demonstraram que IL-4 é capaz de bloquear a expressão de IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , e superóxidos, entre outros (Banchereau and Rybak, 1994; Buckley *et al.*, 1995).

Por outro lado, uma vez estimulados, mastócitos são liberadores de histamina, que é um mediador inflamatório, com ações vasodilatadoras e broncoconstrictoras, além de participarem da secreção de ácido gástrico e de neurotransmissão (Rang *et al.*, 1996). Entretanto, histamina quando atuando sobre receptores H₂, possuem efeitos imunoreguladores, tais como: ativação de células supressoras, inibição da proliferação de linfócitos, e inibição da quimiotaxia de neutrófilos (Rocklin, 1977; Ogden and Hill, 1980; Beer *et al.*, 1984).

A histamina pode ainda atuar sobre macrófagos (receptores H₂) inibindo a liberação das citocinas TNF- α (Dohlsten *et al.*, 1988) e IL-1, de anion superóxido, fagocitose (Azuma *et al.*, 2001) e, pode atuar sobre o próprio mastócito, inibindo

também a produção de TNF- α (Bissonnette, 1996), além de, ao mesmo tempo, induzir a expressão de IL-10 (Sirois *et al.*, 2000), que é outra citocina antiinflamatória bem caracterizada.

Semelhante ao papel de histamina sobre macrófagos, Bury e colaboradores (1992) demonstraram que histamina bloqueia a migração de neutrófilos em câmara de Boydem (*in vitro*), e que na verdade, neutrófilos expostos a histamina estariam hipo-responsivos (Seligmann *et al.*, 1983). E, em 1991, Hirasawa e colaboradores, utilizando o modelo de bolsa de ar em ratos, demonstraram que o bloqueio de receptores H₂ pela administração de cimetidina ou famotidina, aumentou a migração de neutrófilos induzida por carragenina, sugerindo assim que histamina liberada de mastócitos na bolsa de ar estariam modulando a migração de neutrófilos induzida pela carragenina.

Estudos realizados com lectinas da família das Diocleas, com afinidade glicose-manose, demonstraram que estas lectinas estimulavam mastócitos peritoneais de ratos e mastócitos da bolsa (bochecha) de hamsters, a liberarem histamina. Foi visto também que estas lectinas embora com semelhanças estruturais e apenas algumas pequenas mudanças em sua seqüência de aminoácidos, diferiam em potência e eficácia, a capacidade de estimular os mastócitos (Gomes *et al.*, 1994; Ferreira *et al.*, 1996; Cavada *et al.*, 2001).

Dessa maneira, como estas lectinas são novas moléculas, ainda não esclarecidos seus mecanismos de ação, não nos é improvável que tais moléculas, atuando sobre mastócitos, possam lhes estimular a liberarem histamina ou IL-4, que modulariam a resposta dos macrófagos e neutrófilos, ou pela inibição da produção de citocinas como TNF- α e IL-1 ou pela estimulação da produção de IL-10. Observando de um outro ângulo, seria ainda possível que estas lectinas poderiam

esta estimulando os macrófagos a expressarem uma maior quantidade de receptores H_2 .

Como vimos, as quatro lectinas possuem efeito pró-inflamatório, embora interajam diferentemente, como vimos nos experimentos realizados no citômetro de fluxo, e que estas diferentes interações sejam responsáveis provavelmente, pelas variações de eficácia, potencia e mecanismo de ação (**Tabela 8, Figuras 56, 57, 58, 59**).

Essas diferenças de efeitos e interações celulares entre as três lectinas ligadoras de glicose-manose dá-se, possivelmente, por pequenas diferenças estruturais e por diferenças nas especificidades fina dessas lectinas. Nesse contexto, Cavada e colaboradores (2001), demonstraram em uma revisão de trabalhos feita pelo seu grupo, com lectinas da família das Diocleas, todas ligadoras de glicose-manose, que as lectinas estudadas induziam, ou não, a produção de IL-4, IL-10, TNF- α , GMCSF, IFN γ , histamina, e ON (experimentos realizados em diferentes células), de diferentes maneiras, ou seja, que as lectinas embora com estruturas semelhantes e ligadoras de um mesmo carboidrato, possuem potência e eficácia diferentes, sobre as diversas células, embora estudadas sob as mesmas condições. Explicam ainda que essas diferenças de potência e efeitos dá-se por diferença na especificidade fina destas lectinas, bem como, do arranjo de suas estruturas físicas que deixariam expostos epítomos diferentes.

Dessa maneira ressaltamos a importância deste trabalho no curso do estudo destas proteínas, como primeiro passo no estabelecimento das interações e atividades biológicas da mesma, abrindo perspectivas do uso destas lectinas em outros ensaios biológicos.

TABELA 8

**SUMÁRIO DA INTERAÇÃO DAS LECTINAS AS CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE
E SEUS EFEITOS SOBRE OS EXPERIMENTOS DE MIGRAÇÃO**

	PAL Glic-Man	AMA Glic- Man	HTA Glic-Man	BVL Lac-Galac	
MN	+++	++	++	+++	Experimentos de Migração de Neutrófilos
Inibição açúcar	Inibiu	Inibiu	Inibiu	Inibiu	
Lavagem da cavidade	Não alterou a migração	Não alterou a migração	Não alterou a migração	Migração baixou	
Tg	Aumentou a migração	Aumentou a migração	Não alterou a migração	Aumentou a migração	
MN sobrenadante de MØ incubado com a lectina	++++	+++	zero	++	
48/80	MN aumentou	MN igual	MN aumentou	MN aumentou	
MN in vitro	++++	++	++	++++	
MØ	238%	625%	89%	479%	
MC	363%	279%	187%	136%	
Neutrófilos	792%	213%	243%	213%	
Monócitos /HL60	453%	486%	94%	281%	Aumento da Intensidade de Fluorescência
MØ Pré- incubados com sobrenad de MØ est com lectina	Aumentou a interação	Aumentou a interação	Não aumentou a interação	Não aumentou a interação	
MC Pré- incubados com sobrenad de MØ est com lectina	Não aumentou a interação	Aumentou a interação	Não aumentou a interação	Aumentou a interação	
MØ: macrófagos, MC: mastócitos, MN: migração de neutrófilos, Tg: tioglicolato,					

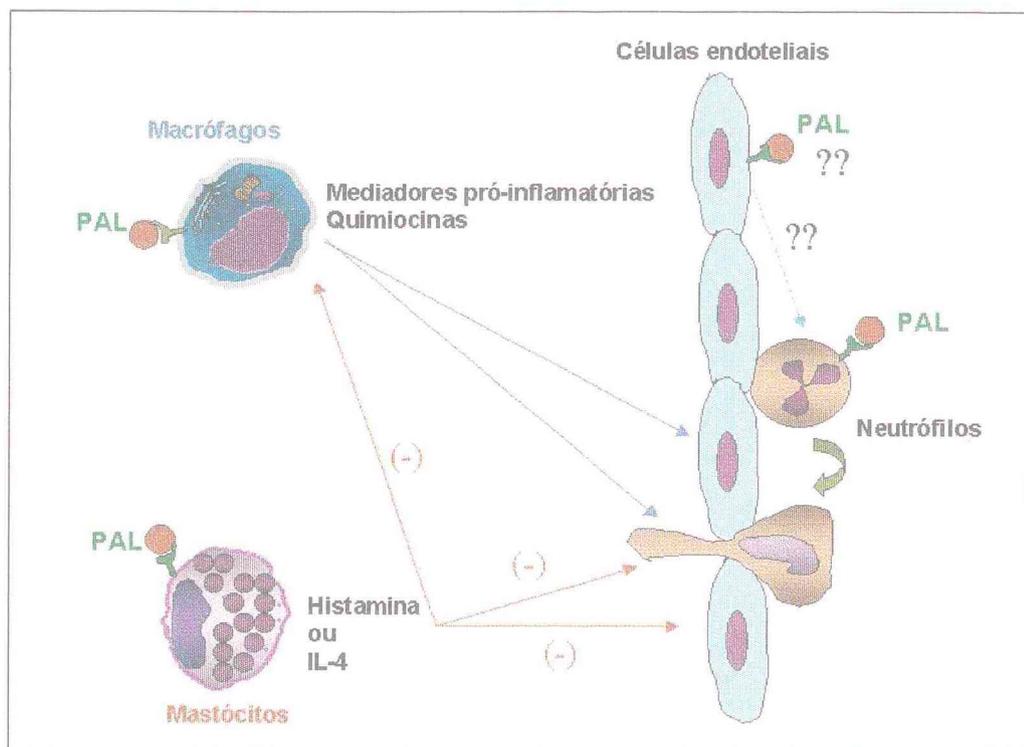


Figura 56. Hipótese de mecanismo de efeito de da lectina de *Pisum arvense* na migração de neutrófilos. A migração de neutrófilos induzida por PAL dar-se por mecanismo dependente e independente de células residentes. a) PAL liga-se à macrófagos, mastócitos e neutrófilos; b) ativa macrófagos induzindo, possivelmente, a liberação de fatores quimiotáticos; c) ativa mastócitos a possivelmente liberarem substâncias moduladoras da quimiotaxia de neutrófilos; d) induz quimiotaxia de neutrófilos direta e indiretamente.

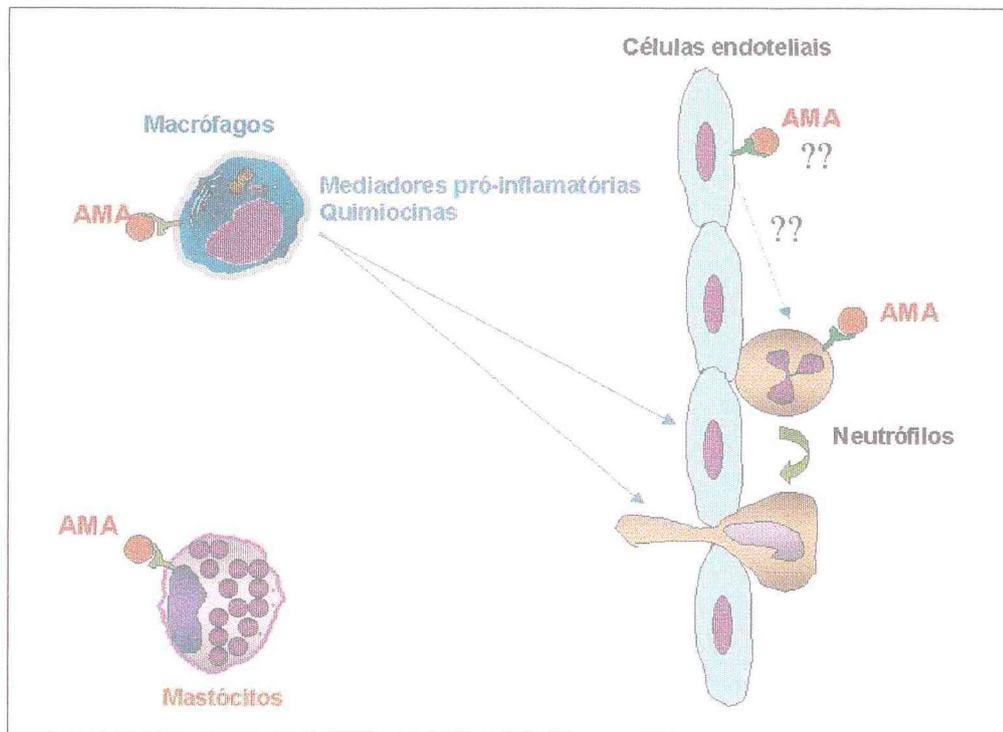


Figura 57. Hipótese de mecanismo de ação da lectina de *Arum maculatum* na migração de neutrófilos. A migração de neutrófilos induzida por AMA ocorre por mecanismos dependente e independente de células residentes. a) AMA liga-se à macrófagos, mastócitos e neutrófilos; b) ativa macrófagos induzindo possivelmente a liberação de substâncias quimiotáticas; c) Parece não ativar mastócitos; d) induz quimiotaxia de neutrófilos diretamente e indiretamente.

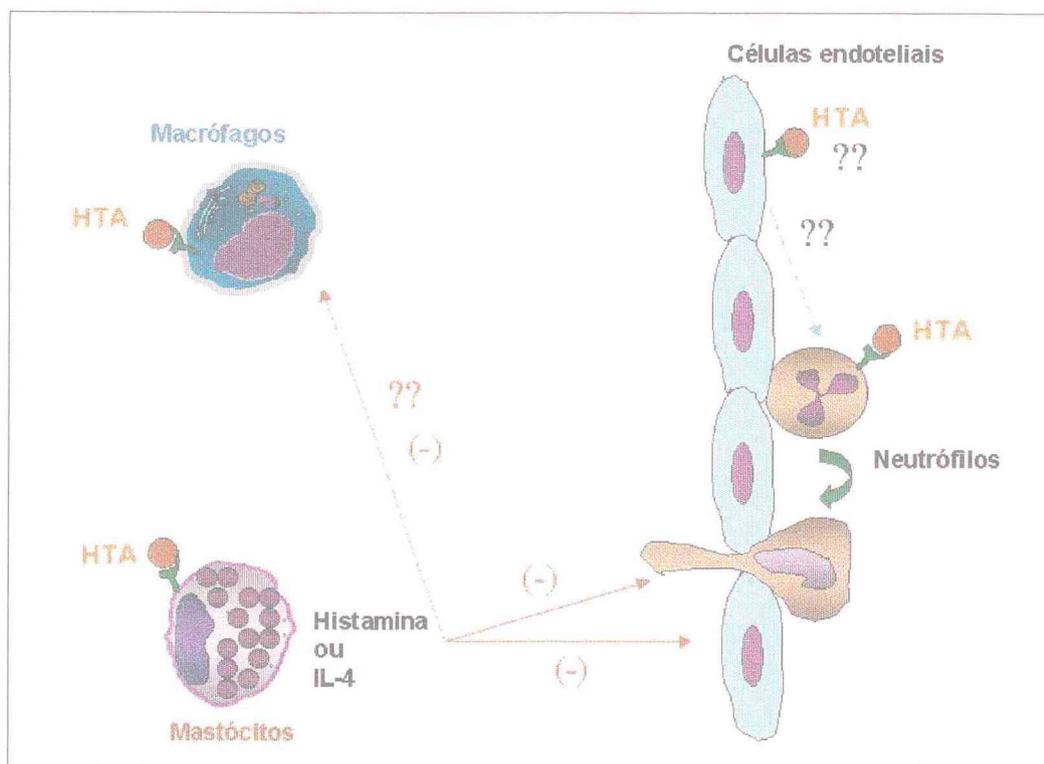


Figura 58. Hipótese de mecanismo de ação da lectina de *Helianthus tuberosus* na migração de neutrófilos. A migração de neutrófilos induzida por HTA dar-se por mecanismo dependente e independente de células residentes. a) HTA liga-se à macrófagos, mastócitos e neutrófilos; b) parece não ativar macrófagos; c) Ativa mastócitos e estes possivelmente liberam substâncias que modulam a migração de neutrófilos; d) induz quimiotaxia de neutrófilos diretamente.

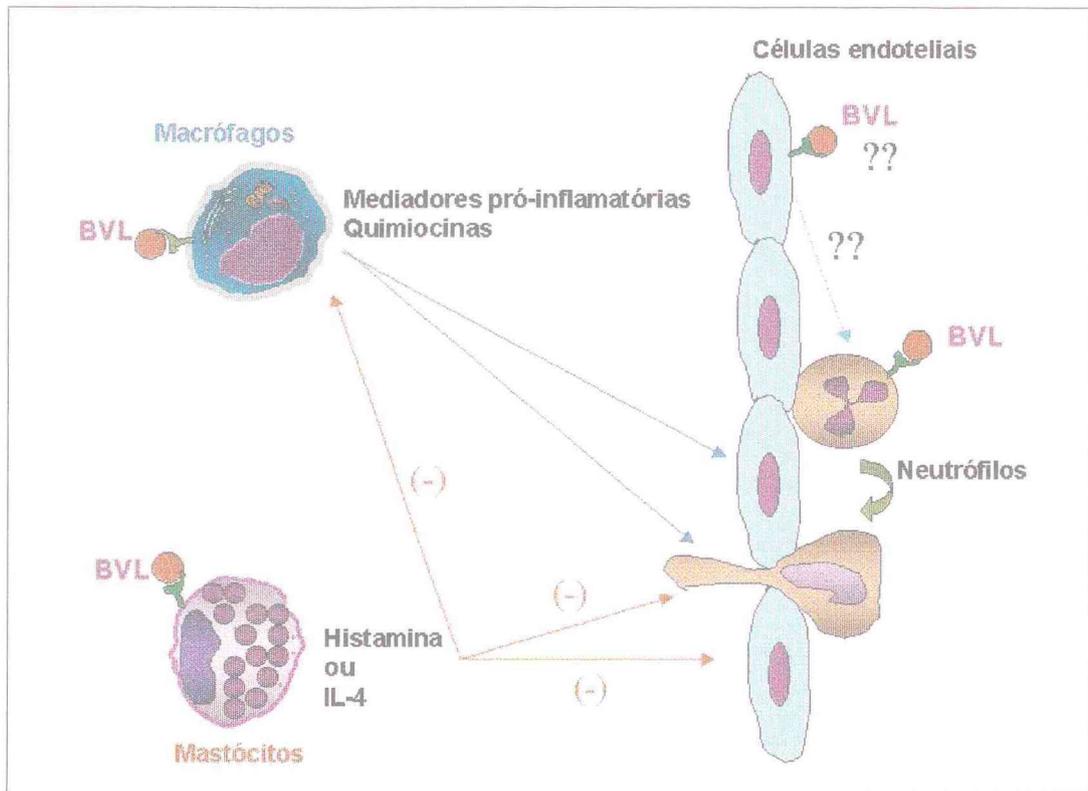


Figura 59. Hipótese de mecanismo de ação da lectina de *Bauhineae variegata* na migração de neutrófilos. A migração de neutrófilos induzida por BVL ocorre por mecanismo dependente e independente de células residentes. a) BVL liga-se à macrófagos, mastócitos e neutrófilos; b) ativa macrófagos induzindo possivelmente a liberação de fatores quimiotáticos; c) ativa mastócitos a liberarem um modulador da quimiotaxia de neutrófilos; d) induz quimiotaxia de neutrófilos direta e indiretamente.

V. CONCLUSÕES

V- CONCLUSÕES

a) Gerais:

Este trabalho sugere que ligações lectínicas a carboidratos presentes na superfície de células inflamatórias possuem importantes ações estimulatórias, e que estas ligações podem ser de fundamental importância no controle ou modulação do comportamento fisiológico clássico das células.

b) Específicas:

O conjunto dos dados em relação as lectinas de *Pisum arvense*, *Arum maculatum*, *Helianthus tuberosus* e *Bauhinia variegata*, nos leva a sugerir que:

- As lectinas de *Pisum arvense*, *Arum maculatum*, *Helianthus tuberosus* e *Bauhinia variegata* possuem atividades pró-inflamatórias *in vivo* e *in vitro*.
- A migração de neutrófilos induzida por PAL, AMA, HTA e BVL é mecanismo dependente e independente de células residentes.
- As lectinas de *Pisum arvense*, *Arum maculatum*, *Helianthus tuberosus* e *Bauhinia variegata* ligam-se significativamente à macrófagos, e mastócitos de ratos, e à monócitos e neutrófilos humanos, entretanto HTA foi a lectina que mostrou menor interação aos macrófagos e monócitos.
- As lectinas de *Pisum arvense*, *Arum maculatum*, e *Bauhinia variegata*, mas não *Helianthus tuberosus*, ativam macrófagos à liberarem, possivelmente, fatores quimiotáticos e/ou citocinas.

- As lectinas de *Pisum arvense*, *Helianthus tuberosus*, e *Bauhinia variegata*, mas não *Arum maculatum*, ativam mastócitos à liberarem, possivelmente, fatores que modulam a migração de neutrófilos.

V-REFERÊNCIAS

V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., POBER, S. Effector mechanisms of immunoglobulin E-initiated immune reactions. **In: Cellular and Molecular Immunology**. Abbas, ABUL K. 4ªEd., Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2000. cap. 14, p. 279-313.
- ABDULLAEV, F.I. and MEJIA, E.G. Antitumor effect of plant lectins. **Natural Toxins**, 1997; 5: 157-163.
- AKGUL, C., MOULDING, D.A. and EDWARDS, S.W. Molecuylar control of neutrophil apoptosis. **FEBS Letters**, v. 487, p. 318-322, 2001.
- ALENCAR, N. M. N. Atividade inflamatória das lectinas de sementes *Vaitarea macrocarpa* e de *Dioclea violacea*. TESE (Doutorado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, 2001.
- ALENCAR, N. M. N., TEIXEIRA, E. H., ASSREUY, M. A. S., CAVADA, B. S., FLORES, C. A., RIBEIRO, R. A., Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediators Inflamm.**, v. 8, p. 107-113, 1999.
- ALENCAR, V.B.M., MELO, S.C., ALBUQUERQUE, K.F., FIGUEIREDO, I.S.T., TUPINAMBÁ, D.D., FREITAS, B.T., ALENCAR, N.M.N., SAMPAIO, A.H., RIBEIRO, R.A., and CAVADA, B.S. Pro-inflammatory effect of galactose binding lectin isolated from *Caesalpinia echinata lam* seeds. **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, v.16, 2002 (Disponivel em: <http://plab.ku.dk/tcbh/Lectins16/Alencar/paper.htm>).
- ALLEWAERT, K., SARANDESES, LA., MOURINO, A., CONVENTS, R., TAN, B-K., ZHAO, J. and BOUILLON, R. Antagonistic activity of 24-oxa-analogs of vit D. **Steroids**. v. 60, p. 484-490, 1995.

ANDRADE, J.L., ARRUDA, S., BARBOSA, T., PAIM, L., RAMOS, M.V., CAVADA, B.S. and BARRAL-NETTO, M. Lectin-induced nitric oxide production. **Cell. Immunol.**, v. 194, n. 1, p. 98-102, 1999.

ASSREUY A.M.S. Atividade pró-inflamatória da espermedesina suína PSP-I/PSP-II em neutrófilos de ratos: Mecanismos de ação e papel de células residestes. TESE (Doutorado em Farmacologia) – Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de medicina: Universidade Federal do Ceará, 2000.

ASSREUY, A.M.S., MARTINS, G. J., MOREIRA, E. E. F., BRITO, G. A. C., CAVADA, B.S., RIBEIRO, R.A., FLORES, C.A., Prevention of Cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. **J. Urol.**, v.161, p. 1988-1993, 1999.

ASSREUY, A.M.S., CALVETE, J.J., ALENCAR, N.M.N, CAVADA, B.S., ROCHA-FILHO, D.R., MELO, S.C., CUNHA, F.Q., RIBEIRO, R.A. Spermadhesin PSI-PSII heterodimer and Its isolated subunits induced neutrophil migration into the peritoneal cavity of rats. **Biol. Reprod.**, v. 67, p. 1796-1803, 2002a.

ASSREUY, A.M.S., ALENCAR, N.M.N, CAVADA, B.S., ROCHA-FILHO, D.R., FEITOSA, RFG., CUNHA, F.Q., CALVETE, J.J., RIBEIRO, R.A. Porcine spermadhesin PSI-PSII stimulated macrophages to release a neutrophil chemotactic substance. Modulation by mast cells. **Biol. Reprod.**, v. 00, p. 0000, 2002b. [*in press*]

ASSREUY, A.M.S., SHIBUYA, M.D., MARTINS, G.J., SOUZA, M.L. P., CAVADA, B.S., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, J.T.A., RIBEIRO, R. A., FLORES, C.A. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators Inflamm.**, v. 6, p. 201-210, 1997.

ASSREUY, J., CUNHA, F.Q., EPPERLEIN, M., NORONHA-DUTRA, A., O'DONNELL, C.A., LIEW, F.Y. and MONCADA, S. Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. **Eur. J. Immunol.**, v. 24, n. 3, p. 672-676, 1994.

- AUB, J.C., Sanford, B.H. and WANG, L.H. Reactions of normal and leukemic cell surfaces to a wheat germ agglutinin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 54, n. 2, p. 400-402, 1965.
- AZUMA, Y. SHINOHARA, M., WANG, P.L., HIDAKA, A., OHURA, K. Histamine inhibits chemotaxis, phagocytosis, superoxide anion production, and the production of TNF α and IL-12 by macrophages via H₂-receptors. **Int. Immunopharmacol.**, v. 1, n. 9-10, p. 1867-1975, 2001.
- BALDWIN, A.S.J. The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. **Annu. Rev. Immunol.**, v.14, p. 649-681, 1996.
- BALZARINI, J., NEYTS, J., SCHOOLS, D., HOSOYA, M., Van DAMME, W., PEUMANS, W. and De CLERCQ, E. The mannose-specific plant lectins from *Cymbidium hybrid* and *Epipactis hellebifera* and the (N-acetylglucosamine)n-specific plant lectin from *Urtica dioica* are potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus replication *in vitro*. **Antiviral Res**, v. 18, n. 2, p. 191-207, 1992.
- BANCHEREAU, J. and RYBAK, M.E. Interleukin-4, In: **The cytokine handbook**, Thomson, A. 2^a Ed; California: Academic Press INC, 1994. cap.6, p. 99-126.
- BANKS, E.M.S. and COLEMAN, J.W. A comparative study of peritoneal mast cells from mutant IL-4 deficient and normal mice: evidence that IL-4 is not essential for mast cell development but enhances secretion via control of IgE binding and passive sensitization. **Cytokine**, v. 8, n. 3, p. 190-196, 1996.
- BARBOSA T., ARRUDA S., CAVADA BS., RODRIGUES LA., GRANGEIRO TB & BARRAL-NETTO M. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of Diocleinae Subtribe. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 673-678, 2001.
- BARGATZE, R.F., KURK, S., BUTCHER, E.C. and JUTILA, M.A. Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells. **J. Exp. Med.**, v. 180, p. 1785-1792, 1994.

- BARNES, P.J. and ADCOCK, I.M. NF- κ B: a pivotal role in asthma and a new target for therapy. **TiPS.**, v. 18, p. 46-50, 1997.
- BARONDES S.M., COOPER D.N.W., GITT, M.A. and LEFFLER, H. Galectins – Structure and function of a large family of animal lectins. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 33, p. 20807-20810, 1994.
- BARRAL-NETTO, M., SANTOS, S.B., BARRAL, A., MOREIRA, L.I.M., SANTOS, C.F., OLIVEIRA, R.A. and CAVADA, B.S. Human Lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleae tribe. **Immunol. Invest.**, v. 21, n. 4, p. 297-303, 1992.
- BAUM, L.G., PANG, M., PERILLO, N.L., Wu, T., DELEGEANE, A., UITTENBOGAART, C.H., FUKUDA, M. and SEILHAMER, J.J. Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, galectin-1, which binds to core 2 O-glycans on thymocytes and T lymphoblastoid cells. **J. Exp. Med.**, v. 181, p. 877-887, 1995.
- BEER, D.J., MATLOFF, S.M. and ROCKLIN, R.E. The influence of histamine on immune and inflammatory responses. **Adv. Immunol.**, v. 35, p. 209-268, 1984.
- BEIL, W.J., LOGIN, G.R., AOKI, M. MORGAN, E.S. GALLI, S.J. and DVORAK, A.M. Tumor necrosis factor-alpha immunoreactivity of rat peritoneal mast cells granules decreases during early secretion induced by compound 48/80: an ultrastructural immunogold morphometric analysis. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 109, n. 4, p. 383-389, 1996.
- BEIL, W.J., LOGIN, G.R., GALLI, S.J. and DVORAK, A.M. Ultrastructural immunogold localization of tumor necrosis factor-alpha to the cytoplasmic granules of rat peritoneal mast cells with rapid microwave fixation. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 94, n. 3, p. 531-536, 1994.

- BENTO, C.A.M., CAVADA, B.S., OLIVEIRA, J.T.A., MOREIRA, R.A. and BARJA-FIDALGO, C. Rat paw edema and leukocyte emmigration induced by plant lectins. **Agent. Act.**, v. 38, p. 48-54, 1993.
- BEN-YOSEF, R., OR, R., NAPARSTEK, E., KAPELUSHNIK, J., SAMUELS, S., SLAVIN, S. and NAGLER, A. Should soybean agglutinin purging be performed in breast cancer patients undergoing autologous stem cell transplantation? A retrospective analysis of 48 patients. **Am. J. Clin. Oncol.**, v. 20, n. 4, p. 419-423, 1997.
- BEVILACQUA, M. P., NELSON, R. M., MANNORI, G. and CECCONI, O. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. **Annu. Rev. Med.**, v. 45, p. 361-378, 1994.
- BEVILACQUA, M.P., BUTCHER, E.C., FURIE, B., GALLATIN, M., GIMBRONE, M., HARLAN, J., KISHIMOTO, K., LASKY, L., McEVER, P., PAULSON, J., SEED, B., SIEGELMAN, M., SPRINGER, T., STOOLMAN, L., TEDDER, T., VARKI, A., WAGNER, D., WEISSMAN, I. And ZIMMERRMAN, G. Selectins: a family of adhesion receptores. **Cell**. v. 67, n. 2, , p. 233, 1991.
- BIEDERMANN, T., KNEILLING, M., MAILHAMMER, R., MAIER, K., SANDER, C.A., KOLLIAS, G., KUNKEL, S.L., HÜLTNER, L. and RÖCKEN, M. Mast cells control neutrophil recruitment during T cell-mediated delayed-type hypersensitivity reactions throug tumor necrosis factor and macrophage inflammatory protein 2. **J. Exp. Med.**, v. 192, n. 10, p. 1441-1451, 2000.
- BISSONNETTE, E.Y. Histamine inhibits tumor necrosis factor α release mast cells through H₂ and H₃ receptors. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 14, p. 620-626.
- BLASER, C., KAUFMANN, M., MÜLLER, C., ZIMMERMANN, C., WELLS, V., MALLUCI, L. and PIRCHER, H. α -Galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibitis antigen-induced proliferation of T Cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, n. 8, p. 2311-2319, 1998.

- BOYCE, P.C. The genus *Arum*, London: HMSO Books Ed, 1993.
- BUCKLEY, M.G., WILLIAMS, C.M.M., THOMPSON, J., PRYOR, P., RAY, K., BUTTERFIELD, J.H. and COLEMAN, J.W. IL-4 enhances IL-3 and IL-8 gene expression in a human leukemic mast cell line. **Immunology**, v. 84, p. 410-415, 1995.
- BUKU, A., PRICE, J.A., MENDLOWITZ, M. and MASUR, S. Mast cell degranulating peptide binding to RBL-2H3 mast cells receptors and inhibits IgE binding. **Peptides**, v. 22, p. 1993-1998, 2001.
- BURG, N.D. and PILLINGER, M.H. The neutrophil: function and regulation in innate and humoral immunity. **Clin. Immunol.**, v. 99, n. 1, p. 7-17, 2001.
- BURY, T.B., CORHAY, J.L. and RADERMECKER, M.F. Histamine-induced inhibition of neutrophil chemotaxis and T-lymphocyte proliferation in man. **Allergy**, v. 47, n. 6, p. 624-629, 1992.
- CALVETE, J. J., SANZ, L., DOSTÁLOVÁ, Z., TOPFER-PETERSEN, E. Spermadhesins: sperm-coating proteins involved in capacitation and zona pellucida binding. **Fertilität.**, v.11, p. 35-40, 1995.
- CALVETE, J. J., SOLÍS, D., SANZ, L., DIAZ-MAURINÓ, T., SCHÄFER, W., MANN, K., TÖPFER-PETERSEN, E. Characterization of two glycosylated boar spermadhesins. **Eur. J. Biochem.**, v.218, p. 719-725, 1993.
- CARTER, W.O. and ROBINSON, J.P. Neutrophil-endothelial cell interactions. In: Robinson, J.P. and Babcock, G.F. **Phagocyte function: a guide for research and clinical evaluation**. Wiley-Liss, Inc., 1998, cap. 10, p. 253-276.
- CAVADA, B.S., BARBOSA, T., ARRUDA, S., GRANGEIRO, T.B. and BARRAL-NETTO, M. Revisiting proteus: Do minor changes in lectins structures matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the diocleinae subtribe lectins. **Curr. Prot. Pept. Sci.**, v. 2, p. 123-135, 2001.

- CARBONARI, M., CIBATI, M. PESCE, A.M., GRADINI, R., MODESTI, A. and FIORILLI, M. Multiparameter flow cytometry for determining DNA content in whole cells. In: PARKER, J. and STUWART, C. Purdue Cytometry CD-ROM (Series). Ed: Purdue University Cytometry laboratories. v. 3, 1997.
- CHARAN, R.D., MUNRO, M.H., O'KEEFE, B.R., SOWDER, R.C.H., McKEE, T.C., CURRENS, M.J., PANNELL, L.K. and BOYD, M.R. Isolation and characterization of myrianthus holstii lectin, a potente HIV-1 inhibitory protein from the plant *Myrianthus holstii*(1). **J. Nat. Prod.**, v. 63, n. 8, p. 1170-1174, 2000.
- COLEMAN, J.W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **Int Immunopharmacol.**, v. 1, p. 1397-1406, 2001.
- COOPER, D.N., and BARONDES, S.H. Evidence for export of a muscle lectins from cytosol to extracellular matrix and for novel secretory mechanism. **J. Cell Biol.**, v. 110, p. 1681-1691, 1990.
- COOPER, D.N., MASSA, S.M., and BARONDES, S.H. Endogenous muscle lectins inhibit myoblast adhesion to laminin. **J. Cell. Biol.**, v. 115, p. 1437-1448, 1991.
- CUMMINGS, R.D. Structure and function of the selectin ligand PSGL-1. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32 n. 5, p. 519-528, 1999.
- CUNHA, F. Q., and FERREIRA, S. H., The release of a neutrophil factor from peritoneal macrophage by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 129, n. 1-2, p. 65-76, 1986.
- DELGADO, G., PUENTES, F., MORENO, A. and PATARROYO, M.E. Flow cytometry, a useful toll for detecting the lethal effect of pentamidine on *Leishmania viannia* complex promastigote forms. **Pharmacol. Res.**, v. 44, p. 281-286, 2001.
- DI ROSA, M., GIROUD, J. P., WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenin and turpentine. **J. Pathol.**, v. 104, p. 15-29, 1971.

- DOHLSTEN, M., KALLAND, T., SJOEGREN, H.O. and CARLSON, R. Histamine inhibits interleukin 1 production by lipopolysaccharide-stimulated human peripheral blood monocytes. **Scand. J. Immunol.**, v. 27, p. 527-532, 1988.
- DRICKAMER, K., and TAYLOR, M.E. Evolving views of protein glycosylation. **Trends Biochem. Sci.**, v. 23, p. 321-324, 1998.
- DUFFY, A.J., NOLAN, B., SHETH, K., COLLETTE, H., MITA, D., BANKEY, P.E. Inhibition of alveolar neutrophil immigration in endotoxemia is macrophage inflammatory protein 2 independent. **J. Surg. Res.**, v. 90, p. 51-57, 2000.
- DUKE, J.A. Medicinal plants. **Science**. v. 229, n. 4718, p. 1036-1038, 1985.
- FACCIOLI, L.H., SOUZA, G.E.P., CUNHA, F.Q., POOLE, S. and FERREIRA, S.H. Recombinant interleukin-1 and tumour necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms. **Agents Actions.**, v.30, p. 344-349, 1990.
- FERREIRA, R.R., CAVADA, B.S., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, J.T.A. and GOMES, J.C. Characteristics of the histamine release from hamster cheek pouch mast cells stimulated by lectins from Brazilian beans and concavalin A. **Inflamm. Res.**, v. 45, p. 442-447, 1996.
- FRIBERG, J.R.S., GOLUB, S.H., LILLIEHOOK, B. and COCHRAN, A.J. Assessment of concavalin a reactivity to murine ascites tumores by inhibition of tumor cell migration. **Exp. Cell Res.**, v. 73, p. 101-106, 1972.
- FRIER, T. and RÜDIGER, H. Lectin-binding proteins from lentil seeds as mitogens for murine B lymphocytes. **Phytochemistry**, v. 29, p. 1459-1461, 1990.
- FUHLBRIGGE, R.C., ALON, R., PURI, K.D., LOWE, J.B. and SPRINGER, T.A. Sialylated, fucosylated ligands for L-selectin expressed on leukocytes mediate tethering and rolling adhesions in physiologic flow conditions. **J. Cell Biol.**, v. 135, p. 837-848, 1996.

- FUKADA, M., BOTHNER, B., RAMASAMOOJ, P., DELL, A., TILLER, PR., VARKI, A. and KLOCK, J.C. Structures of sialylated fucosyl polylectosaminoglycans isolated from chronic myelogenous leukemia cells. **J. Biol. Chem.**, v. 260, p. 12957-12967, 1985.
- FUKUDA, M., HIRAOKA, N. and YEH, J.C. C-Type lectins and sialyl lewis X oligosaccharides: Versatile roles in cell-cell interaction. **J. Cell Biol.**, v. 147 n. 3, p. 467-470, 1999.
- FUKUISHI, N., SAKAGUCHI, M., MATSUURA, S., NAKAGAWA, C., AKAGI, R. and AKAGI, M. The mechanism of compound 48/80-induced superoxide generation mediated by A-kinase in rat peritoneal mast cells. **Biochem. Mol. Med.**, v. 61, p. 107-113, 1997.
- FUKUSHIMA, K. Characterization of sialosylated Lewis S as a new tumor-associated antigen. **Cancer Res.**, v. 44, p. 5279-5285, 1984.
- GANGULY C. & DAS SUKUTA. Antitumour activity of two plants Indian. **J. Cancer Chemother**, v. 13, p. 41-44, 1991.
- GANGULY C. & DAS SUKUTA. Plants Lectins as inhibitors of tumor growth and modulators of host immune response. **Chemotherapy**, v. 40, p. 272-278, 1994.
- GEBAUER, G., SCHIMPL, A. and RÜDIGER H. Lectin-binding proteins as potent mitogens for B-lymphocytes from nu/nu mice. **Eur J Immunol** v. 12, p. 491-495, 1982.
- GENGOZIAN, N., REYES, L., PU, R., HOMER, BL., BOVA, FJ. and YAMAMOTO, J.K. Fractionation of feline bone marrow with the soybean agglutinin lectin yields populations enriched for erythroid and myeloid elements: transplantation of soybean agglutinin-negative cells into lethally irradiated recipients. **Transplantation.**, v. 64, n. 3, p. 510-518, 1997.

- GO, N.F., CASTLE, B.E., BARRET, R., KASTELEIN, R., DANG, W., MOSMANN, T.R., MOORE, K.R. and HOWARD, M. Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. **J. Exp. Med.** v. 172, p. 1625-1631, 1990.
- GOMES, J.C., CAVADA, B.S., MOREIRA, R.A. and OLIVEIRA, J.T.A. Histamine release induced by glucose (mannose) specific lectins isolated from brazilian plants. Comparison with concavalin A. **Agent. Act.**, v. 41, p. 132-135, 1994.
- GREENBERG, S. and GRINSTEIN, S. Phagocytosis and innate immunity. **Curr. Op. Immunol.**, v. 14, p. 136-145, 2002.
- GUILLOT, J., GRIFFAUT, B., De JAEGHER, G. and DUSSER, M. Isolation and partial characterization of a lectin from Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus* L.) **C.R. Acad. Sci.**, v. 312, p.573-578, 1991.
- HAVT, A., TEIXEIRA, E.H., MARTINS, A.M.C., NASCIMENTO, K.S., GRANGEIRO, M.B., MORENO, F.B.M.B., SAMPAIO, A.H., MENESES, D.B., FONTELES, M.C., CAVADA, B.S. and MONTEIRO, H.S.A. Reversion of the renal effects induced by the lectin *Canavalia brasiliensis* THROUGH ITS SPECIFIC SUGAR INHIBITOR. **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, v.16, 2002 (Disponível em: <http://plab.ku.dk/tcbh/Lectins16/Havt/paper.htm>).
- HIRASAWA, N., WATANABE, M., MUE, S., TSURUFUJI, S. and OHUCHI, K. Downward regulation of neutrophil infiltration by endogenous histamine without affecting vascular permeability responses in air-pouch-type carragenin inflammation in rats. **Inflammation**, v. 15, n. 2, p. 117-126, 1991.
- ITO, N., LI, Y., SUZUKI, T., STECHSCHULTE, D.J. and DILEEPAN, K.N. Transient degradation of NF-kappaB proteins in macrophages after interaction with mast cell granules. **Mediators Inflamm.**, v. 7, n. 6, p. 397-407, 1998.
- ITZKOWITZ, S.H., YUAN, M., FUKUSHI, Y., LEE, H., SHI, Z.R., ZURAWSKI, V.Jr., HAKOMORI, S. and KIM, Y.S. Immunohistochemical comparison of Le^a,

monosialosyl Le^a(CA 19-9) and disialosyl Le^a antigens in human colon rectal and pancreatic tissues. **Cancer Res.**, v. 48, p. 3834-3842, 1988.

JOHNSTON, B. and KUBES, P. The α_4 -integrin: an alternative pathway for neutrophil recruitment? **Immunol. Today.**, v. 20, n. 12, p. 545-560, 1999.

JUNQUEIRA, L.C. and CARNEIRO, J. Células do Sangue. In: JUNQUEIRA, L.C. and CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 8ª Ed, Guanabara Koogan, 1995, cap. 12, p. 192-204.

KELLER, R. Dendritic cells: their significance in health and disease. **Immunol. Letters**, v. 78, p. 113-122, 2001.

KIEDA C. Role of lectin-glycoconjugate recognitions in cell-cell interactions leading to tissue invasion. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 435, p. 75-82, 1998.

KIM, M-S., LIM, W-K., CHA, J-G., AN, N-H., YOO, S-J., PARK, J-H., KIM, H-M., LEE, Y-M. The activation of PI 3-K ξ and PKC in PMA-induced differentiation of HL-60 cells. **Cancer Letters**. v. 171, p. 79-85, 2001.

KISHI, F., NAKAYA, Y. and ITO, S. Histamine H₂-receptor-mediated nitric oxide release from porcine endothelial cells. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 32, n. 2, p. 177-182, 1998.

KLIMP, A.H., VRIES, E.G.E., SCHERPHOF, G.L. and DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 44, n. 2, p. 143-161, 2002.

KULKARNI, G.V. and MCCULLOCH, C.A.G. Concavalin A induced apoptosis in fibroblasts: The role of cell surface carbohydrates in lectin mediated cytotoxicity. **J. cell. Physiol.**, v. 165, p. 119-133, 1995.

LEE, Y., DUNLAP, B.E. and MELLON, W.S. Induction of monocytic differentiation by calcitriol (1,25-dihydroxyvitamin D₃) in the human promyelocytic leukemic cell line

(HL60) in serum-free medium. **Biochem Pharmacol.**, v. 36, n. 22, p. 3893-3901, 1987.

LEMUS, I., GARCIA, R., DELVILLAR, E. and KNOP, G. Hypoglycaemic activity of four plants used in Chilean popular medicine. **Phytother. Res.**, v. 13, n. 2, p. 91-94, 1999.

LEVI, G., TARRAB-HAZDAI, R. and TEICHBERG VI. Prevention and therapy with electrolectin of experimental autoimmune myasthenia gravis in rabbits. **Eur. J. Immunol.**, v. 13, p. 500-507, 1983.

LIEW, F.Y. and McINNIS, I.B. The role of innate mediators in inflammatory response. **Mol. Immunol.**, v. 38, p. 887-890, 2001.

LINEHAN, A.S., MARTINEZ-POMARES, L. and GORDON, S. Macrophage lectins in host defence. **Microbes and Infection**. v. 2, p. 279-288, 2000.

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

LORIS, R., HAMELRYCK, T., BOUCKAERT, J. and WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1383, p. 9-36, 1998.

LUSTER, A.D. The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. **Cur. Op. Immunol.**, v. 14, p. 129-135, 2002.

MADDOX, D.E., GOLDSTIN, I.J., LOBUGLIO, A.F. *Griffonia simplicifolia* I lectin mediated macrophage induced cytotoxicity against Ehrlich ascites tumour. **Cell. Immunol.**, v. 71, p. 202-207, 1982.

MAGANANI, J.L., NILSSON, B., BROCKHAUS, M., ZOPF, D., STEPLEWSKI, Z., KOPROWSKI, H. and GINSBURG, V. A monoclonal antibody-defined antigen associated with gastrointestinal cancer is a ganglioside containing sialylated lacto-N-fucopentaose II. **J. Biol. Chem.**, v. 257, n. 23, p. 14365-14369, 1982.

- MATSUMOTO, R., MATSUMOTO, H., SEKI, M., HATA, M., ASANO, Y., KANEGASAKI, S., STEVENS, R.L. and HIRASHIMA, M. Human ecalectin, a variant of human galectin-9, is a novel chemoattractant produced by T lymphocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 273 n. 27, p. 16976-16984, 1998.
- McCARTHY, D.M., SAN MIGUEL, J.F., FREAKE, H.C., GREEN, P.M., ZOLA, H., CATOVSKY, D. and GOLDMAN, J.M. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits proliferation of human promyelocytic leukaemia (HL60) cells and induces monocyte-macrophage differentiation in HL60 and normal human bone marrow cells. **Leuk Res.**, v. 7, n. 1, p. 51-55, 1983.
- McEVER R.P. Selectin-carbohydrate interactions during inflammation and metastasis. **Glycoconj. J.**, v. 14, p. 585-591, 1997.
- MEDZHITOW, R. and JANEWAY, J.C.A. Innate immunity: impact of the adaptive immune response. **Curr. Op. Immunol.**, v. 9, p. 4-9, 1997.
- MIKI, I., KUSANO, A., OHTA, S., HANAI, N., OTOSHI, M., MASAKI, S.? SATO, S., OHMORI, K. Histamine enhanced the TNF-alpha-induced expression of E-selectin and ICAM-1 on vascular endothelial cells. **Cell. Immunol.**, v. 171, n. 2, p. 285-288, 1996.
- MITCHELL, R.A. and BUCALA, R. Tumor growth-promoting properties of macrophages migration inhibitory factor (MIF). **Sem. Cancer Biol.**, v. 10, p. 359-366, 2000.
- MOREIRA, R.A., AINOUZ, I.L., DE OLIVEIRA J.T. and CAVADA, B.S. Plant Lectins, chemical and biological aspects. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 2, p. 211-218, 1991.
- MOSMANN, T.R. Interleukin-10. In: **The cytokine handbook**, Thomson, A. 2^a Ed; California: Academic Press INC, 1994, cap.12, p. 223-237.

- NAKAGAWA, H., SHIOTA, S., TAKANO, K., SHIBATA, F. and KATO, H. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC)-2 alpha, a novel member of rat GRO/CINC family, is a predominant chemokine produced by lipopolysaccharide-stimulated rat macrophages in culture. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** V. 220, p. 945-948, 1996.
- OFFNER, H., CELNIK, B., BRINGMAN, T.S., CASENTINI-BOROCZ, D., NEDWIN, G.E. and VANDENBARK, A.A. **J. Neuroimmunol.**, v. 28, n. 2, p. 177-184, 1990.
- OGDEN, B.E. and HILL, H.R. Histamine regulates lymphocyte mitogenic responses through activation of specific H1 and H2 histamine receptors. **Immunology**, v. 41, p. 107-114, 1980.
- OLIANI, S.M., LIM, L.H.K., CHISTIAN, H.C., PELL, K. DAS, A.M. and PERRETTI, M. Morphological alteration of peritoneal mast cell and macrophages in the mouse peritoneal cavity during the early phases of an allergic inflammatory reaction. **Cell. Biol. Int.**, v. 25, n. 8, p. 795-803, 2001.
- OLIVEIRA, S.H.P., COSTA, C.H.S., FERREIRA, S.H. and CUNHA, F.Q. Sephadex induces eosinophil migration to the rat and mouse peritoneal cavity: involvement of mast cells, LTB4, TNF- α , IL-8 and PAF. **Inflamm Res.**, v. 51, p. 144-153, 2002.
- OOSTELVED, K.V., DOSOGNE, H., BURVENICH, C., PAAPE, M.J., BROCHEZ, V. and VAN DE EECKHOUT, E. Flow Cytometric procedure to detect apoptosis of bovine polymorphonuclear leukocytes in blood. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 70, p. 125-133, 1999.
- PECANHA, L.M., SNAPPER, C.M., LEES, A. YAMAGUCHI, H. and Mond, J.J. IL-10 inhibits T cell-independent but not T cell-dependent responses in vitro. **J. Immunol.**, v. 150, p. 3215-3223, 1993.
- PEISER, L., MUKHOPADHYAY, S. and GORDON, S. Scavenger receptors in innate immunity. **Curr. Op. Immunol.**, v. 14, p. 123-128, 2002.

- PERILLO, N.L., PACE, K.E., SEILHAMER, J.J. and BAUM, L.G. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. **Nature**. v. 378, n. 6558, p. 736-739, 1995.
- PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defence proteins. **Plant Physiol.**, v.109, p. 347-352, 1995.
- PINTO, L.S. Purificação e caracterização parcial de lectina de sementes de *Bauhinia variegata* L. Dissertação de mestrado (Mestrado em Botânica) - Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pelotas, 2000.
- PINTO, V. P. T. Utilização de lectinas na detecção de receptores de glicídeos de células neoplásicas. TESE (Doutorado em Bioquímica) – Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, 2001.
- PLACIDO, R., MANCINI, G., AMENDOLA, A., MARIANI, F., VENDETTI, S., PIACENTINI, M., SANDUZZI, A., BOCCHINO, M.L., ZEMBALA, M. and COLIZZI, V. Apoptosis of human monocytes/macrophages in *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J. Pathol.**, v. 181, p. 31-38, 1997.
- POLLI, N., O'BRIEN, M., TAVARES DE CASTRO, J., RODRIGUEZ, B., McCARTHY, D. and CATOVSKY, D. Monocytic differentiation induced by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in myeloid cells: an ultrastructural immunocytochemical study. **Leuk. Res.**, v. 9, n. 2, p. 259-270, 1985.
- PUSZTAI, A. **Plant lectins**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p. 263.
- RABINOVICH G.A., RIERA, C.M., LANDA, C.A. and SOTOMAYOR, C.E. Galectins: a key intersection between glycobiology and immunology. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, n. 4, p.383-393, 1999.
- RABINOVICH, G., CASTAGNA, L., LANDA, C., RIERA, C.M. and SOTOMAYOR, C. Regulated expression of a 16-kd galectin-like protein in activated rat macrophages. **J. Leuk. Biol.**, v. 59, n. 3, p. 363-370, 1996.

- RAMIREZ, D.C., and GIMENEZ, M.S. Lipid modification in mouse peritoneal macrophages after chronic cadmium exposure. **Toxicol.**, v. 172, p. 1-12, 2002.
- RANG, H.P., DALE, M.M. and RITTER, J.M. **PHARMACOLOGY**. 3ª Ed, Churchill Livingstone, 1996, cap. 11, p. 214-245.
- RAO, S.D., CAMPBELL, M.J., KOEFFLER H.P., ISHIZUKA, S., USKOKOVIC, M.R., SPAGNUOLO, P. and REDDY, S. Metabolism of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in human promyelocytic leukemia (HL60) cells: in vitro biological activities of the natural metabolites of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ produced in HL60 cells. **Steroids**. v. 66, p. 423-431, 2001.
- RIBEIRO, R. A., FLORES, C. A., CUNHA, F. Q., FERREIRA, R. A. IL-8 *in vivo* neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. **Immunology**, v. 73, p. 472-477, 1991.
- RIBEIRO, R. A., SOUZA-FILHO, M. V. P., SOUZA, M. H. L. P., OLIVEIRA, S. H. P., COSTA, C. H. S., CUNHA, F. Q., FERREIRA, S. H. P. Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB₄, fMLP and C5a des arg. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 112, p. 27-35, 1997.
- RIBEIRO, R.A., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. Recombinant gamma interferon causes neutrophil migration mediated by the release of a macrophage neutrophil chemotactic factor. **Int. J. Exp. Pathol.**, v. 71, p. 717-725, 1990.
- RIBEIRO, R.A., VALE, M.L., THOMAZZI, S., PASCHOALATO, A.B. P., POOLE, S., FERREIRA, S.H. and CUNHA, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 387, p. 111-118, 2000.
- ROBBINS, S.L. , KUMAR V., COTRAN R.. Cellular Injury and Cellular Death, In: Robbins, S.L. , Kumar V., Cotran R. **Pathologic Basis of Disease**. 5ª Ed., W.B. Saunders Company., 1994, cap. 1, p. 1-34.

- ROBINSON, J.P. and CARTER, W.O. Flow Cytometric analysis of granulocytes. In: Clinical flow cytometry. Principles and applications. BAUER, K.D., DUQUE, R.E. and SHANKEY, T.V. Ed: Williams & Wilkins, Baltimore, 1992, cap. 24, p. 405-433.
- ROCKLIN, R.E. Histamine-induced suppressor factor (HSF):effect on migration inhibitory factor (MIF) production and proliferation. **J. Immunol.**, v. 118, p. 1734-1738, 1977.
- RODRIGUEZ, D., CAVADA, B.S., OLIVEIRA, J.T.A., MOREIRA, R.A. and RUSSO, M. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/manose-binding plant lectins. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 25, p. 823-826, 1992.
- RÜDIGER, H. Plant Lectins – More than just tools for Glycoscientists: occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. **Acta Anat.**, v. 161, p. 130-152, 1998.
- RÜDIGER, H. and GABIUS, H.J. Plant Lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconj J.**, v. 18, n. 8, p. 589-613, 2001
- SAITOH, O., WANG, W.C., LOTAN, R. and FUKUDA, M. Differential glycosylation and cell surface expression of lysosomal membrane glycoprotein in sub lines of a human colon cancer exhibiting distinct metastatic potentials. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 5700-5711, 1992..
- SCHALL, T.J. The chemokines. In: **The cytokine handbook**, Thomson, A. 2ªEd, Academic Press INC, Califórnia, 1994, cap. 22, p. 420-460.
- SCHMIDT-CHOUDHURY, A., FURUTA, G.T., LAVIGNE, J.A., GALLI, S.J. and WERSHIL, B.K. The regulation of tumor necrosis factor- α production in murine mast cells: pentoxifyline or dexamethasone inhibits IgE-dependent production of TNF- α by distinct mechanisms. **Cell. Immunol.**, v. 171, p.140-146, 1996.

- SCHRADER, J.W. Interleukin-3. In: **The cytokine handbook**, Thomson, A. 2^aEd, Academic Press INC, Califórnia, 1994, cap. 5, p. 81-98.
- SELIGMENN, B.E., FLETCHER, M.P. and GALLIN, J.I. Histamine modulation of human neutrophil oxidative metabolism, locomotion, degranulation, and membrane potential changes. **J. Immunol.**, v. 130, n. 4, p. 1902-1909, 1983.
- SHARON, N. and LIS, H. Lectins—proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. **Essays Biochem.**, v. 30, p. 59-75, 1995.
- SHIBATA, F., KONISHI, K., KATO, H., KOMORITA, N., FUJIOKA, M. and NAKAGAWA H. Recombinant production and biological properties of rat cytokine-induced neutrophil chemoattractants GRO/CINC-2, CINC-2 β , and CINC-3. **Eur. J. Biochem.**, v. 231, p. 306-311, 1995.
- SHIMODAIRA, K., NAKAYAMA, J., NAKAMURA, N., HASEBE, O., KATSUYAMA, T. and FUKUDA M. Carcinoma-associated expression of core 2 α -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase gene in human colon rectal cancer: role of O-glycans in tumor progression. **Cancer Res.**, v. 57, p. 5201-5206, 1997.
- SHOHAM, M., INBAR, M., SACHS, L. Differential toxicity on normal and transformed cells in vitro and inhibition of tumor development in vivo by concanavalin A. **Nature**, v.227, p. 1244-1246, 1970.
- SILVA, L.M., RAMOS, M.V., CAJAZEIRAS, J.B., FERREIRA, P.R., CARVALHO, C.A.V., GRANGEIRO, T.B., NUNES, E.P., SAMPAIO, A.H., FREITAS, B.T., SILVEIRA, J.A.G., CAVADA, B.S. Lectin from *Pisum arvense* seeds behave differently from storage proteins during germination in the darkness. **Rev. Braz. Fisiol. Veg.**, v. 12, n. 3, p. 255-265, 2000.
- SIMON, S.I., ROCHON, Y.P., LYNAM, E.B., SMITH, C.W., ANDERSON, D.C. and SKLAR, L.A. Beta 2-integrin and L-selectin are obligatory receptors in neutrophil aggregation. **Blood**, v. 82, p. 1097-1106, 1993.

- SIROIS, J., MENERD, G., MOSES, A.S. and BISSONNETTE, E.Y. Importance of histamine in the cytokine network in the lung through H₂ and H₃ receptors: Stimulation of IL-10 production. **J. Immunol.**, v. 164, p. 2964-2970, 2000.
- SOUZA, C. A. M., FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions.**, v. 17, n. 1, p. 97-103, 1985.
- STILMARK, H. Über ricin ein giftiges ferment aus den samen von *Ricinus communis* L. und einnigen anderen Euphorbiacacen. Tese (PHD Thesis) Dorpat University, Estonia, 1888.
- SWAIN, S.D., ROHN, T.T. and QUINN, M.T. Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 4, n. 1, p. 69-83, 2002.
- TODA, T., SADI, A.M., EGAWA, H., ATARI, E., QURESHI, B. and NAGAI, Y. Affinity of four lectins for endocervical and endometrial non-neoplastic and neoplastic glandular epithelium. **Histopathology**, v. 32, p. 257-263, 1998.
- TUDOR, K.R.S., HESS, K.L., COOK-MILLS, J.M. Cytokines modulate endothelial cell intracellular signal transduction required for VCAM-1-dependent lymphocyte transendothelial migration. **Cytokine**, v. 15, n. 4, p. 196-211, 2001.
- VALE, M.L., MARQUES, J.B., MOREIRA, C.A., ROCHA, F.A.C., FERREIRA, S.H., POOLE, S., CUNHA, F.Q. and RIBEIRO, R.A. Antinociceptive effects of interleukin-4, -10, and -13 on the writhing response in mice and zymosan-induced knee joint incapacitation in rats. **J. Pharmacol. Exp. Therap.** v. 304, n. 102, p. 102-108, 2003.
- VAN DAMME, E.J.M., BARRE, A., MAZARD, A.M., VERHAERT, P., HORMA, A., DEBRAY, H., ROUGE, P. and PEUMANS, W.J. Characterization and molecular cloning of the lectin *Helianthus tuberosus*. **Eur. J. Biochem.**, v. 259, p. 135-142, 1999.



- VAN DAMME, E.J., GOOSSENS, K., SMEETS, K., Van LEUVEN, F., VERHAERT, P., PEUMANS, W.J. The major tuber storage protein of araceae species is a lectin. Characterization and molecular cloning of the lectin from *Arum maculatum* L. **Plant Physiology**, v. 107, n. 4, p. 1147-1158, 1995.
- VAN DRIESSCHE, E. Structure and function of leguminosae lectins. **Adv. Lectins Res.**, 1988; 1:73-134.
- WAGNER, J.G. and ROTH, R.A. Neutrophil migrations mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacol. Rev.**, v. 52, n. 3, p.349-374, 2000.
- WANG, H.X. and NG, T.B. Examination of lectins, polysaccharopeptide, polysaccharide, alkaloid, coumarin and trypsin inhibitors for inhibitory activity against human immunodeficiency virus reverse transcriptase and glycohydrolases. **Planta Med.**, v. 67, n. 7, p. 669-672, 2001.
- WAKAHARA, S., FUJII, Y., NAKAO, T., TSURITANI, K., HARA, T., SAITO, H. and RA, C. Gene expression profiles for FcεRI, cytokines and chemokines upon FcεRI activation in human cultured mast cells derived from peripheral blood. **Cytokine**, v. 16, n. 4, p. 143-152, 2001.
- WEDMORE, C. V. and WILLIAMS, T. J. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. **Nature**, v. 289, p. 646-650, 1981.
- WEYDE, J., WABERMENN, K. and SCHELL-FREDERICK, E. Analysis of single and double-stained alveolar macrophages by flow cytometry. **J. Immunol Methods.**, v. 207, p. 115-123, 1997.
- WILKINSON, P.C. Cell locomotion and chemotaxis: Basic concepts and Methodological approaches. **Methods: Comp. Method. Enzimol.**, v.10, p. 74-81, 1996.

YANG, R.B., DOMINGOS, C.K., WASSSERMAN, S.M., COLMAN, S.D., SHENOY, S., MEHRABAN, F., KÖMÜVES, L.G., TOMLINSON, J.E. and TOPPER, J.N. Identification of a novel family of cell-surface proteins expressed in human vascular endothelium. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 46364-46373, 2002.

YANG, R.Y. HSU, D.K. and LIU, F.T. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p. 6737-6742, 1996.

YE, X.Y., NG, T.B., TSANG, P.W. and WANG, J. Isolation of a homodimeric lectin with antifungal and antiviral activities from red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. **J. Protein Chem.**, v. 20, n. 5, p. 367-375, 2001.

