

***Talisia esculenta* (St. Hill, Radlk): imunogenicidade em camundongos e efeito sobre parâmetros biológicos dos carrapatos *Boophilus microplus* (Canestrini, 1785) e *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806).**

Maria Verônica Moraes Campello

TESE SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA, COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM BIOQUÍMICA

Universidade Federal do Ceará

FORTALEZA - CE

2005

DIFERENTE DA  
FOLHA DE ROSTO!

M819i

Moraes-Campelo, Maria Verônica

Imunogenicidade da lectina de *Talisia esculenta* (St.Hill) Radik e efeito sobre os parâmetros biológicos dos carrapatos *Boophilus microplus* (Canestrini, 1785) e *Rhipicephalus sanguineus* (Canestrini, 1785) e *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) / Maria Verônica Moraes Campello.

130f. : il.

Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

Orientador: Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo

Área de Concentração :

1. *Talisia esculenta* 2. Imunogenicidade 3. Carrapatos I. Melo, Dirce Fernandes de II. Universidade Federal do Ceará – Mestrado em Bioquímica III. Título

CDD 574.192

CDU 577.1

Esta tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central de Ciências e Tecnologia da referida Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

María Verônica Moraes Campello.

Tese aprovada em: 30/03/2005.

---

Dra. Dirce Fernandes de Melo  
Universidade Federal do Ceará  
Orientadora

---

Dra. Maria da Guia Silva Lima  
Universidade Federal do Ceará

---

Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro  
Universidade Estadual do Ceará

---

Dra. Maria das Graças Machado Freire  
Institutos Superiores do Ensino CENSA

---

Dr. Arlindo Luiz da Costa  
EMBRAPA  
CNPQ

## O PODER DE UM NOME

Às vezes tenho a impressão  
Que estou sozinha no caminho  
Sem rumo certo, sem alguém  
Que saiba me ensinar por onde ir  
Quem vai cuidar de mim?  
Quem vai chamar o meu nome?  
Será que existe alguém que vai  
Cuidar de mim?  
Já não me entrego a ilusões  
Já me cansei de desenganos  
Promessas já nem quero ouvir  
Palavras de quem nada pode dar  
Mas não desisto da esperança  
Me resta ainda um nome  
Pra chamar **JESUS**  
Diante dEle a terra treme  
Nome que é sobre todo o nome  
Ele é quem fazer por mim  
Que todo medo chegue ao fim  
Como é grande o poder do  
Nome de **JESUS**  
Se algum mal me sobrevêm  
Não vou chamar por mais ninguém  
Não existe potestade  
Opressão e enfermidade  
Que resistam ao poder  
Nome de **JESUS**  
**JESUS!**  
Só de pronunciar teu nome  
Tudo já mudou  
Se a dor ou aflição vierem outra vez  
Eu já sei, **JESUS!**  
Teu nome vou chamar.

Sérgio Lopes (álbum Yeshua)

## Dedicatória

A DEUS, o Senhor de tudo. Ao Senhor da minha vida, ofereço.

À minha mãe ANÁLIA, benção dos céus para mim;  
Ao meu esposo CLÁUDIO, meu precioso bem, dádiva do Senhor;  
Aos meus filhos NATHAN e LIA, heranças do Senhor,  
A vocês com amor dedico.

## Agradecimentos

A **Deus**, Senhor de toda criação.

À Profa. **Maria da Guia Silva Lima**, pelo crédito de confiança, pela orientação, incentivo, apoio e compreensão desde os meus primeiros passos no curso de pós-graduação.

À Profa. **Dirce Fernandes de Melo**, por ter aceito o desafio da orientação final, pelo seu apoio incontestável e pelas sugestões mais que oportunas.

À Profa. **Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro**, da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, pelas sugestões valiosas e pela amizade desde o nosso ingresso na UECE.

Às Profas. **Maria Lígia R. Macedo** e **Maria das Graças M. Freire** mães da lectina de *Talisia esculenta* (TEL), pela concessão das alíquotas utilizadas nos experimentos, pela atenção e disponibilidade, dispensadas a nós.

Ao Prof. **Renato Azevedo Moreira**, pela co-orientação, pelo exemplo de capacidade e por tantas contribuições ao longo do curso.

Ao Prof. **Benildo de Sousa Cavada**, pelo encorajamento e pela concessão sem precedentes do material destinado à técnica de fluorescência.

Às Profas. **Izabel (UECE)** e **Deijanira (UFMT)**, pela sugestões mais que pertinentes e pela amizade.

Às amigas **Roseane** e **Helena** do Laboratório de Nutrição Animal (Departamento de Zootecnia), pelo apoio na realização da análise elementar.

Aos demais **professores do Departamento** de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo conhecimento transmitido, pelo material e equipamentos particulares compartilhados.

Aos colegas **Edson** e **Vítor** pela disponibilidade no preparo do material da técnica de fluorescência e pela amizade.

À amiga **Adriana Queiroz** pelos preciosos momentos compartilhados e valiosa amizade.

Aos colegas do laboratório, Daniel, Márcia Rocha, Alana, Hélio, Erika, Isabella, Lourdinha, Edson, Márcia Martins, Alessandra, Luciana, Yuri, Gabriela, Leiliane, em especial a Ana Cláudia pela sua dedicação em conduzir os ELISA e passar os conhecimentos relativos a ele.

Aos demais colegas de curso pela amizade e tantos momentos compartilhados Isabel, Nilka, Teresa, Fábio, Éder, Wagner, Desireé, Luiziete, Lia, Cristina, Angélica, Cláudia, Daniele, Renata, Sônia, Tatiani, Kátia, Carlos, Silvana.

Aos funcionários da secretaria do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, agradeço a atenção.

Ao Prof. Santos Filho, diretor da Faculdade de Veterinária (UECE), por tantas concessões.

Aos colegas do Setor de Parasitologia (FAVET) Lineuda, Armando e Kelma, pelo apoio sempre presente.

Aos funcionários José Lino, Marcos e Pedro (FAVET) pela inestimável colaboração.

Aos colegas Veterinários Elisa, Elionice, Helana e Isaac, pela preciosa colaboração em vários dos passos deste trabalho.

Às queridas Adriana Wanderley e Helena Terazaki, grandes e ternas amigas.

Ao amigo Facó e ao meu esposo Cláudio, pelo incomensurável apoio na análise estatística.

Ao meu esposo Cláudio, aos meus filhos Nathan e Lia, a minha mãe Anália e aos meus irmãos, por fazerem parte do universo da minha vida... o qual não haveria alegria, sem eles.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para que obtivéssemos êxito neste trabalho.

## **Agradecimentos Institucionais**

À Universidade Estadual do Ceará (UECE), por ter me proporcionado a chance de galgar mais uma etapa na minha vida acadêmica.

À Faculdade de Veterinária (FAVET), pelo apoio incomensurável a essa batalha.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), pela acolhida, pelos tantos conhecimentos ofertados pelo seu corpo docente.

À Fundação de Apoio e Amparo à Pesquisa do Ceará (FUNCAP), que proveu apoio financeiro a este trabalho, sob a forma de bolsa de estudos.



## Sumário

	Páginas
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	01
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	
Lectinas e a resposta imunológica.	
Lectinas de plantas: interação com carboidratos e seu papel na indução de respostas biológicas específicas.	06
Lectinas vegetais e seus efeitos nas pragas que afetam culturas agrícolas.	09
Lectinas de origem vegetal com especificidade para quitina.	12
<i>Talisia esculenta</i> (St. Hill) Radlk.	13
A lectina de <i>Talisia esculenta</i> (St. Hill) Radlk e suas atividades biológicas	15
A resposta Imunológica	17
Resposta Inata	18
Resposta Adquirida.	20
Mediada por anticorpos	20
Vias de indução da resposta imunológica.	21
A via subcutânea	21
A via nasal.	22
Efeito Adjuvante de algumas lectinas	29
Os Ixodidas parasitas das espécies domésticas.	31
O controle das populações de <i>Ixodidas</i> .	39
<b>3. OBJETIVOS GERAIS</b>	
<b>3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	
<b>4. MATERIAIS</b>	
Animais Experimentais	41
Reagentes Químicos	41
Imunógenos e adjuvantes	41
Sementes de <i>T. esculenta</i>	41
<b>5. METODOLOGIA</b>	
Preparo da farinha de sementes de <i>T. esculenta</i> .	42

Análise elementar da farinha de sementes de <i>T. esculenta</i> .	42
Determinação da Proteína Total	42
Determinação do teor de Lipídios	43
Determinação das Cinzas	44
Determinação da Umidade	44
Determinação da Fibra Bruta	44
Isolamento e purificação da lectina de <i>T. esculenta</i> .	45
Avaliação da resposta imunológica Humoral.	45
Imunização dos camundongos pela via subcutânea.	45
Imunização dos camundongos pela via nasal	46
Colheita dos soros após as imunizações pelas vias subcutânea e nasal	46
Detecção das imunoglobulinas específicas através de ELISA.	49
Estatística.	48
Obtenção dos carrapatos <i>Boophilus microplus</i> e <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .	48
Avaliação dos parâmetros biológicos dos carrapatos <i>Boophilus microplus</i> e <i>Rhipicephalus</i>	49
Estatística.	50
Ensaio de fluorescência para a detecção da lectina de <i>T. esculenta</i> na cutícula dos carrapatos <i>Boophilus microplus</i> e <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .	50
Preparo histológico dos carrapatos para teste de fluorescência.	51
<b>6. RESULTADOS</b>	
Análise elementar de sementes de <i>Talisia esculenta</i> .	52
Efeito da lectina de <i>T. esculenta</i> sobre a resposta imunológica humoral.	56
Resposta imunológica humoral induzida pela via subcutânea.	
Efeito dos carboidratos ligantes na síntese de anticorpos específicos.	58
Efeito imunoadjuvante da lectina de <i>Talisia esculenta</i> em camundongos imunizados com ovalbumina.	60
Resposta imunológica humoral induzida pela via nasal.	62
Efeito dos carboidratos ligantes na síntese de anticorpos específicos.	64
Efeito imunoadjuvante da lectina de <i>Talisia esculenta</i> em camundongos imunizados com a ovalbumina.	65

Efeito da lectina de <i>T. esculenta</i> pura ou associada aos açúcares ligantes, sobre os parâmetros biológicos dos carrapatos <i>Boophilus microplus</i> e <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .	65
<b>7. DISCUSSÃO</b>	73
<b>8. CONCLUSÕES</b>	91
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	92
<b>10. ANEXOS</b>	116

## Lista de Figuras

	Páginas
1 Interações das lectinas com carboidratos em membrana de célula do sistema imunológico.	07
2 Eletroforese da lectina de <i>Talisia esculenta</i> em presença de 12,5% de SDS.	15
3 Desenho esquemático do tegumento dos <i>Ixodidae</i> .	33
4 Síntese de anticorpos específicos (IgM, IgG, IgA) induzida pela lectina de <i>Talisia esculenta</i> em camundongos imunizados com 50 $\mu$ g e 100 $\mu$ g, pela via subcutânea. Títulos determinados através de escores de ELISA.	53
5 Síntese de anticorpos específicos (IgM, IgG, IgA) induzida pela lectina de <i>Talisia esculenta</i> associada aos açúcares ligantes, em camundongos imunizados com 50 $\mu$ g e 100 $\mu$ g, pela via subcutânea. Títulos determinados através de escores de ELISA.	55
6 Efeito imunoadjuvante da lectina de <i>Talisia esculenta</i> sobre a síntese de anticorpos específicos em camundongos imunizados com OVA(100 $\mu$ g), OVA(100 $\mu$ g) + AL(OH) <sub>3</sub> , OVA(100 $\mu$ g) + TEL(50 $\mu$ g) e OVA(100 $\mu$ g) + TEL(100 $\mu$ g) por via subcutânea. Títulos determinados através de escores de ELISA.	57
7 Síntese de anticorpos específicos (IgM, IgG, IgA) induzida pela lectina de <i>Talisia esculenta</i> em camundongos imunizados com 10 $\mu$ g, pela via nasal. Títulos determinados através de escores de ELISA.	59
8 Síntese de anticorpos específicos (IgM, IgG, IgA) induzida pela lectina de <i>Talisia esculenta</i> associada aos açúcares ligantes, em camundongos imunizados com 10 $\mu$ g, pela via nasal. Títulos determinados através de escores de ELISA.	61
9 Efeito imunoadjuvante da lectina de <i>Talisia esculenta</i> sobre a síntese de anticorpos específicos em camundongos imunizados com OVA (10 $\mu$ g), e OVA(10 $\mu$ g) + TEL(10 $\mu$ g) por via nasal. Títulos determinados através de escores de ELISA.	63
10 Curva de regressão da massa total de ovos postos por fêmeas do carrapato <i>Boophilus microplus</i> em função da concentração de TEL.	65
11 Curva de regressão da massa total de ovos postos por fêmeas do carrapato <i>Rhipicephalus sanguineus</i> em função da concentração de TEL	66
12 Efeito da lectina de <i>Talisia esculenta</i> (TEL), pura e pré-tratada com carboidratos específicos, sobre a massa total de ovos postos (PMOT) das fêmeas do carrapato de bovinos <i>Boophilus microplus</i> .	67

- 13 Efeito da lectina de *Talisia esculenta* (TEL), pura e pré-tratada com carboidratos específicos, sobre a perda de peso da quenógena (PQ) do carrapato de bovinos *Boophilus microplus*. 68
- 14 Efeito da lectina de *Talisia esculenta* (TEL), pura e pré-tratada com carboidratos específicos, sobre o índice de eficiência reprodutiva (IER) das fêmeas do carrapato de bovinos *Boophilus microplus*. 69
- 15 Efeito da lectina de *Talisia esculenta* (TEL), pura e pré-tratada com carboidratos específicos, sobre o índice de eficiência nutricional (IEN) das fêmeas do carrapato de bovinos *Boophilus microplus*. 70
- 16 Corte sagital do carrapato *Boophilus microplus*: A- Foto evidenciando a cutícula, ovário e células intestinais (corados pela hematoxilina-eosina) aumento X 40; B- Foto evidenciando a cutícula, e o ovário (material incubado com salina) aumento X 100 71
- 17 Corte sagital do carrapato *Boophilus microplus*: A- Foto evidenciando a cutícula e o ovário (material incubado com a lectina de *Talisia esculenta* conjugada a FITC) aumento X 100; B- Imagem vista em A aumentada X400. 72

## Lista de Tabelas

	Página
1 Composição centesimal de sementes de <i>Talisia esculenta</i>	116
2 Imunogenicidade da lectina de <i>Talisia esculenta</i> (TEL) aplicada por via subcutânea em diferentes doses.	117
3 Efeito dos carboidratos ligantes sobre a imunogenicidade da lectina de <i>Talisia esculenta</i> (TEL) aplicada por via subcutânea.	118
4 Ação adjuvante da lectina de <i>Talisia esculenta</i> (TEL) aplicada por via subcutânea em diferentes doses.	119
5 Imunogenicidade da lectina de <i>Talisia esculenta</i> (TEL) aplicada por via intranasal.	120
6 Efeito dos carboidratos ligantes sobre a imunogenicidade da lectina de <i>Talisia esculenta</i> (TEL) aplicada por via intranasal.	121
7 Ação adjuvante da lectina de <i>Talisia esculenta</i> (TEL) aplicada por via intranasal.	122
8 Efeito da lectina de <i>Talisia esculenta</i> (TEL), pura e pré-tratada com carboidratos específicos, sobre os parâmetros biológicos PMOT, PQ, IER e IEN das fêmeas do carrapato de bovinos <i>Boophilus microplus</i> .	123

## Abreviaturas e Definições

BSA	Albumina Sérica Bovina
Con A	<i>Canavalia ensiformis</i>
Con Br	<i>Canavalia brasiliensis</i>
CT	Toxina do cólera
DGL	<i>Dioclea grandiflora</i>
DVL	<i>Dioclea grandiflora</i>
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
IER	Índice de eficiência reprodutiva
IEN	Índice de eficiência nutricional
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
LSL	<i>Lonchocarpus sericeus</i>
PBS	Tampão fosfato
PMOT	Peso massa de ovos total
PQ	Peso quenógena
SDS	Duodecil Sulfato de Sódio
TEL	Lectina de <i>Talisia esculenta</i>
TNF- $\beta$	Fator de necrose tumoral
UH ou HU	Unidade de Hemaglutinação (Definida como o inverso da maior diluição capaz de causar aglutinação visível em uma suspensão de hemácias a 2% em HCl 0,15M).
WGA	Lectina do gérmen de trigo

## RESUMO

A lectina de sementes de *Talisia esculenta* (TEL) específica manose-glucose, foi investigada em relação à sua imunogenicidade quando aplicada pelas vias subcutânea e intranasal, ao seu potencial papel modulador da resposta imunológica à ovalbumina (OVA) em ambas as vias, à interferência dos açúcares ligantes específicos sobre estas propriedades e à sua ação sobre parâmetros biológicos dos carrapatos *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* parasitas de bovinos e caninos, respectivamente. Os resultados obtidos revelaram que a TEL é imunogênica por via por via nasal e pela via subcutânea demonstrou esse efeito de forma dose-dependente. A imunogenicidade dessa lectina foi influenciada negativamente pelo tratamento prévio com os açúcares específicos e a resposta imune anti-OVA foi acentuada somente após aplicação pela via subcutânea. O tratamento de fêmeas do carrapato *B. microplus* com a TEL causou redução significativa da massa total de ovos postos, descrevendo uma curva de dose resposta de comportamento polinomial. Houve redução causada pela lectina nos índices de eficiência reprodutiva e de eficiência nutricional dos parasitas, efeitos que foram significativamente reduzidos quando a lectina foi previamente tratada com o açúcar ligante específico. Análises por microscopia de fluorescência revelaram que a lectina foi capaz de ligar-se à cutícula daquela espécie de carrapato. Não foi observado efeito significativo da lectina de *Talisia esculenta* sobre os parâmetros biológicos do carrapato dos cães *R. sanguineus*.



## Abstract

The glucose-mannose ligand lectin from *Talisia esculenta* seeds (TEL) was investigated regarding to its immunogenicity after subcutaneous or intranasal applications, its potential role as immunoadjuvant against ovalbumin (OVA), the effect of specific sugars over these properties and lectin actions on biological parameters of ticks *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*, ectoparasites of bovine and dogs, respectively. The results obtained have shown that TEL is immunogenic when applied subcutaneously, in a dose-dependent way. Immunogenicity of the lectin was negatively affected by its previous incubation with the specific ligand sugar. TEL was able to increase immune response against OVA after subcutaneous application, but not after intranasal instillation. Treatment of female *Boophilus microplus* ticks with TEL have caused significant reduction on total laying eggs, reproductive and nutritional efficiency of the parasites, describing a polynomial type dose-response curve for the prior. These effects were significantly reduced by previous treatment of lectin with specific ligand sugars. Analysis by fluorescence microscopy revealed that TEL was able to link to cuticle of that tick. Significant effects of the lectin against dogs ticks *R. sanguineus* were not observed.

## 1. INTRODUÇÃO

Há muitas décadas as lectinas despertam o interesse de pesquisadores das mais diversas áreas, os quais visam, sobretudo as propriedades peculiares dessas proteínas que as tornaram valiosas ferramentas biotecnológicas cada vez mais usadas nos mais diversos campos ciência, seja em bioquímica, histoquímica, imunologia, farmacologia, ou até clínica médica e agronomia. Entretanto, apesar de todo o interesse e do grande volume de investigações já realizadas, até o presente momento nem tudo está esclarecido sobre a ocorrência, funções e aplicabilidades das lectinas. Acredita-se, a julgar pelas fontes inesgotáveis de lectinas, que o futuro ainda promete incessantes pesquisas acerca desse assunto.

Diversas pesquisas têm sido realizadas enfatizando a atividade biológica das lectinas, demonstrando que essas proteínas podem ser amplamente utilizadas não apenas em investigações biológicas e biomédicas, mas também como ferramentas biotecnológicas. Uma importante aplicação biomédica potencial de lectinas vegetais relaciona-se com um possível papel destas proteínas como moduladoras da resposta imunológica.

Das sementes de *Talisia esculenta* (St. Hill) Radlk, popularmente conhecidas como pitombas, foi isolada e purificada recentemente uma lectina com quatro isoformas que apresentam especificidade por carboidratos tais como manose-glucose e N-acetil-D-glucosamina. Essa lectina ainda não foi estudada quanto à sua imunogenicidade, a sua ação moduladora sobre a resposta imune de animais quando administrada pelas vias nasal e subcutânea e seu efeito sobre a reação de hipersensibilidade tardia.

A confirmação da existência de atividade biológica, bem como dos mecanismos de ação das proteínas da pitomba com atividade lectínica, requerem estudos de eventuais alterações histológicas e imunológicas em animais experimentais.

Relativamente às aplicações biotecnológicas, algumas lectinas de plantas têm sido exploradas, entre outras finalidades, na sua ação potencial contra artrópodes de plantas.

Considerando-se que as espécies de insetos e ácaros que atacam vegetais apresentam algumas características morfológicas comuns com as espécies que parasitam animais, pode ser possível a utilização de extratos vegetais ou proteínas purificadas para o controle de parasitas de animais.

Os carrapatos que parasitam animais domésticos atuam como vetores de doenças, prejudicam a o desempenho dos animais e inviabilizam a industrialização do couro, sendo gastos anualmente milhões de dólares com a aquisição de acaricidas químicos e a remuneração de mão-de-obra especializada no seu combate. Além disso, o uso de acaricidas químicos contribui para o aumento da poluição ambiental, compromete a vida dos predadores naturais do carrapato e favorece o aparecimento da resistência através da destruição dos artrópodes sensíveis e concomitantemente da seleção de indivíduos cada vez mais resistentes.

Não existem informações relativas quanto ao uso lectina de *Talisia esculenta* contra pragas dos animais domésticos ou do homem.

A literatura disponível não dispõe de dados relativos aos efeitos que poderiam ser provocados pela lectina de *Talisia esculenta* Radlck sobre as respostas humoral e celular de animais nem sobre os parâmetros biológicos de carrapatos de algumas espécies domésticas.

Desse modo, este trabalho pretende estudar a imunogenicidade e a adjuvantividade da lectina *Talisia esculenta* Radlck, sobre a via subcutânea e a intranasal de camundongos e a resposta sobre a hipersensibilidade do tipo tardia. Bem como os efeitos do banho de imersão sobre parâmetros biológicos das teleóginas dos carrapatos dos bovinos e dos caninos, *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1785) e *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1807), respectivamente e evidenciar a presença dessa lectina nos tecidos desses carrapatos através de fluorescência.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### Lectinas e a resposta imunológica.

O nascimento da lectinologia ocorreu com a descoberta das propriedades aglutinantes da ricina por Hermann Stillmark em 1888, o entanto somente 100 anos depois começou a era moderna dessa ciência com o isolamento e a purificação de diferentes lectinas de plantas por Lis e Sharon.

Alguns vegetais contêm proteínas carboidrato ligantes que comumente são chamadas lectinas, aglutininas ou hemaglutininas. Essas lectinas são encontradas na maioria dos organismos vivos, desde vírus, bactérias, fungos, algas, vegetais superiores e animais (MOREIRA, 1998; ZENTENO *et al.*, 2000; FRAGKIADAKIS, 2000; SASMAL *et al.*, 1999; JIMBO *et al.*, 2000; KOSSOWSKA *et al.*, 1999; VEAU *et al.*, 1999; KAWAGISHI *et al.*, 2001). Elas representam um grupo heterogêneo de proteínas oligoméricas que variam enormemente de estrutura, organização molecular e de seus domínios ligantes (LIS & SHARON, 1998).

Nas espécies vegetais superiores, as lectinas são proteínas que estão presentes principalmente nas sementes, embora tenham sido encontradas também, nas folhas, nas raízes, nas cascas e em outros tecidos (HANKINS *et al.*, 1987; VAN DAMME *et al.*, 1987; PEUMANS *et al.*, 1996). Algumas evidências sugerem que um dos principais papéis biológicos das lectinas é o de conferir proteção contra o ataque de agentes agressores, de forma que a sua presença na dieta está relacionada com fenômenos de toxicidade em animais superiores (PUSZTAI *et al.*, 1994) e a sua ligação a receptores carboidratos presentes nas células intestinais de insetos (FITCHES *et al.*, 1997; FITCHES & GATEHOUSE, 1998; FITCHES *et al.*, 2001) e nas paredes celulares de fungos (XU *et al.*, 1998; CIOPRAGA *et al.*, 1999) e bactérias (GAIDAMASHVILI & VAN STADEN, 2002) podendo conferir danos.

As lectinas foram definidas por Peumans e Van Damme em 1995, como sendo "proteínas carboidrato ligantes, que não eram enzimas ou anticorpos, e que

possuíam no mínimo um domínio não-catalítico capaz de se ligar reversivelmente a carboidrato". Esta definição permitiu que essas proteínas fossem agrupadas de acordo com suas características estruturais em quatro grupos: mero, holo, químero e superlectinas (VAN DAMME *et al.*, 1998). Contudo as diferenças na estrutura molecular, nas propriedades bioquímicas e na especificidade por carboidratos tornaram-nas um grupo de proteínas heterogêneo e complexo (VAN DAMME *et al.*, 1998). E assim surgiu outra classificação de acordo com as semelhanças estruturais e evolutivas (PEUMANAS & VAN DAMME, 1998).

As lectinas foram reconhecidas funcionalmente como carboidratos ligantes por essa razão são assim consideradas, atualmente é o conceito mais aceitável, antes mesmo de se enfatizar atividade hema(aglutinante) (VAN DAMME *et al.*, 1998).

A relevância biológica da atividade das lectinas reside no fato de que numerosos monossacarídeos são encontrados na natureza. E a ligação da lectina com eles é a um nível milimolar, tornando-se altamente seletiva (PEUMANS *et al.*, 1996 e SINGH, TIWARY & KENNEDY, 1999).

Certas lectinas interagem somente com oligossacarídeos, entretanto lectinas de mesma especificidade podem diferir acentuadamente em sua afinidade por tais moléculas (LIS & SHARON, 1998). Essas proteínas ou glicoproteínas, de origem não imune, com afinidade específica por resíduos terminais ou subterminais de carboidratos (LEATHEM & BROOKS, 1997), fazem interação específica e reversível com carboidratos ou glicoconjugados e podem atuar como moléculas de reconhecimento em diversos processos biológicos (LIS & SHARON, 1998).

A principal função das lectinas parece ser no reconhecimento celular. Elas se mostram como uma ferramenta preciosa na investigação de alterações que poderiam ocorrer na superfície celular, durante processos fisiológicos e patológicos (SINGH, TIWARY & KENNEDY, 1999).

Algumas lectinas de plantas têm sido usadas para estudar o papel dos ligantes da membrana plasmática. Essas moléculas podem ligar-se a uma

variedade de receptores de superfície e produzir a estimulação ou a inibição de atividades biológicas diversas (SELL & COSTA, 2003).

Uma vasta quantidade de pesquisas enfatizando a atividade biológica das lectinas tem sido produzida. Embora que, a maioria das investigações tenha sido concentrada em reduzidos grupos de plantas (PEUMANAS & VAN DAMME, 1998), essas lectinas podem ser amplamente utilizadas como ferramentas e proteínas bioativas nas pesquisas biológicas e biomédicas com um esforço voltado para a exploração e desenvolvimento de terapias (KABIR, 1998; DÍAZ *et al.*, 1999; KILPATRIC *et al.*, 1999; NISHMURA *et al.*, 2000).

As investigações revelaram que algumas lectinas podem conter um segundo tipo de sítio ligante que pode interagir com um ligante que não é carboidrato. Podendo dessa maneira possuir várias especificidades que estão associadas com sua habilidade para interagir com acetilaminocarbohidratos, aminocarbohidratos, ácido siálico, hexoses, pentoses, e outros. (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Essas proteínas que ligam carboidratos apresentam significantes habilidades biológicas tais como a aglutinação de células vermelhas, linfócitos células de plantas espermatozóides, fibroblastos, bactérias e fungos (STRATFORD & KUMAR, 1994; HUDSON, 1995 e VAN DAMME *et al.*, 1998). Tendo aplicação em diversos campos clínicos tais como: tipagem de células agentes e carreadores quimioterapêuticos, mitógenos, marcadores específicos de microorganismos, taxonômicos e epidemiológicos (VAN DAMME *et al.*, 1998), Algumas dessas proteínas na forma imobilizada são usadas na separação, purificação tecnológica de carboidratos, glicconjugados, enzimas, imunoglobulinas e células e detecção de doenças graves como nefropatias, mal de Alzheimer e tumores malignos (KABIR, 1998; NISHMURA *et al.*, 2000).

Marcadores histoquímicos quando associados a lectinas de plantas têm sido utilizados para estudar doenças malignas (YANAGIHARA & CHENG, 1999; YU & LIN, 2000), bem como a caracterização de padrões celulares em diversos tecidos humanos ou animais, *in vivo* ou *in vitro* (CLARK *et al.*, 1995; JEPSON *et al.*,

1996; SHARMA *et al.*, 1996; DORSCHIED *et al.*, 1999; TAKATA *et al.*, 2000; MANTIS *et al.*, 2000; YI *et al.*, 2001)

Lectinas de plantas: interação com carboidratos e seu papel na indução de respostas biológicas específicas.

A maioria das proteínas e muitos dos lipídios presentes nas membranas são glicosilados e esses glicanos constituem sítios de ligação para lectinas (BIES *et al.*, 2004).

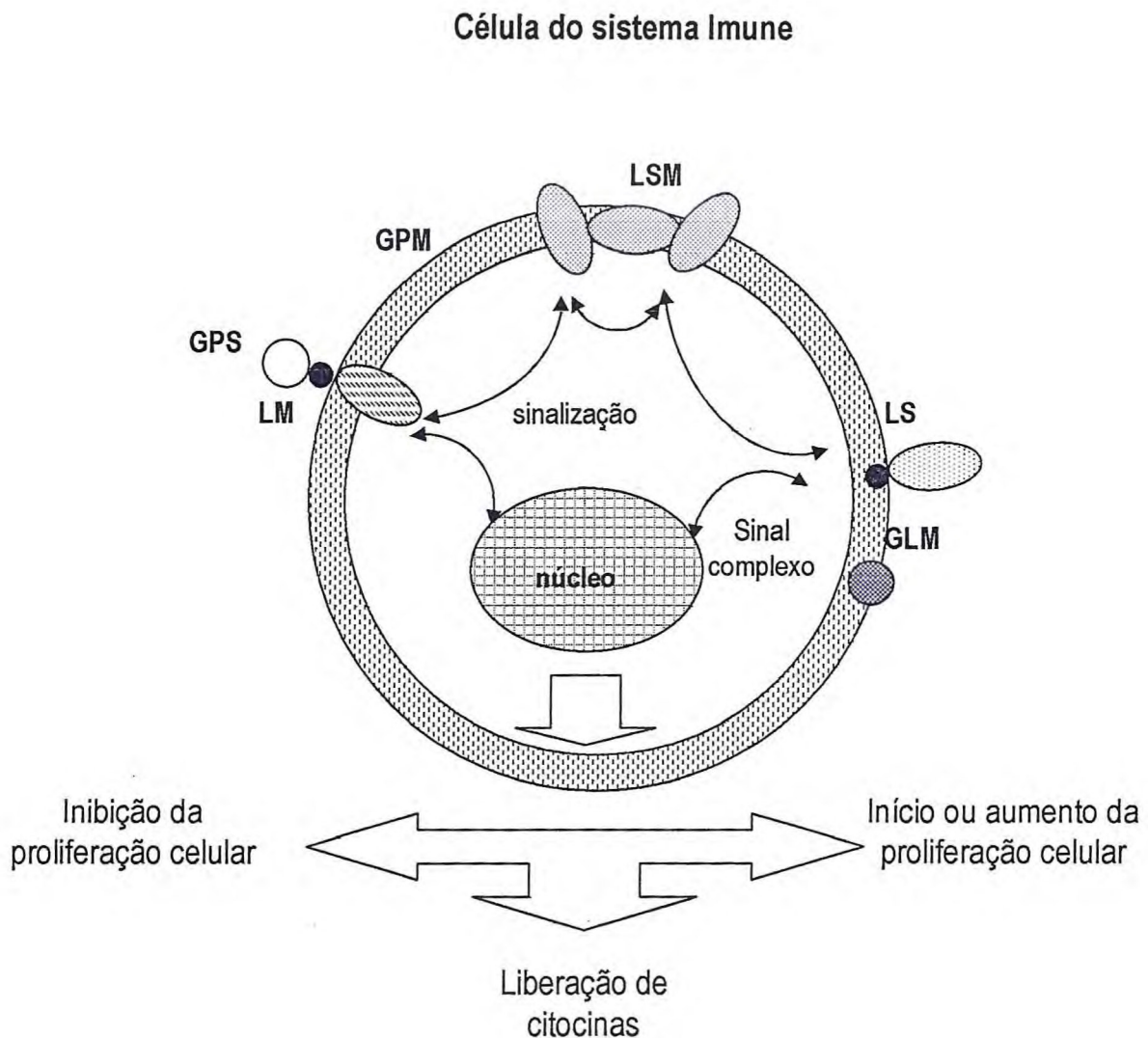
Lectinas ligam-se a glicanos presentes na membrana celular (FIGURA 1) e podem aglutinar moléculas alvo, um passo central para iniciar uma via de sinalização (GABIUS, 2001). Essas moléculas representam uma ferramenta para o estudar o envolvimento de glicoproteínas de membrana no início da resposta inflamatória característica da resposta inata (MURAILLE *et al.*, 1999).

Argumenta-se que os sítios de algumas proteínas que ligam açúcares estão envolvidos com fenômenos biológicos relacionados ao sistema imune, ainda que não estejam esclarecidos os possíveis receptores e as vias bioquímicas que fazem parte deles (McGREAL *et al.*, 2004 e RUDD *et al.*, 2004). O sistema imune consiste de vários tipos celulares e moléculas que interagem especificamente para dar início ao mecanismo de defesa do hospedeiro. As lectinas e os carboidratos têm papel inicial na mediação dessas interações (NI & TIZARD, 1996).

Os carboidratos oferecem alta capacidade para carrear informações, devido ao seu grande potencial de formar estruturas variadas. É importante ressaltar que o arranjo estrutural dos carboidratos é complexo, e os açúcares podem existir como monossacarídeos ou glicoconjugados (NATHAN & LIS, 1993).

Os polímeros de carboidratos insolúveis são amplamente distribuídos nos tecidos animais tanto quanto nos organismos patogênicos (RUDD *et al.*, 2004), eles contribuem para a estabilidade das proteínas (JOAO, 1992) e servem como elemento estrutural e de suporte (van der STEEN, 1998). Em muitas instâncias, eles são uma fonte de informação a ser decodificada pelos sistemas biológicos inclusive o sistema imune (Mc GREAL *et al.*, 2004).

Figura 1. Interações das lectinas com carboidratos em membrana de célula do sistema imunológico. GLM (glicolipídios de membrana), GPM (glicoproteína de membrana), GPS (glicoproteína solúvel), LS (lectina solúvel), LM (lectina de membrana), LSM (lectina solúvel multivalente).



Em virtude dos diferentes tipos celulares expressarem arranjos glicanos diversos, nos últimos anos as moléculas de carboidratos têm sido implicadas nos processos de adesão e ativação celular, inflamação, metastases tumorais e apoptose (NI & TIZARD, 1996; BIES *et al.*, 2004).



Oligossacarídeos podem formar epítomos que trazem conseqüências funcionais ao receptor de ligação. Podendo dar início a algumas atividades biológicas através de mecanismos, que envolvem múltiplas interações de monossacarídeos com receptores (ROYLE *et al.*, 2002). Dois mecanismos permitem que oligossacarídeos façam interação com seus receptores de elevadas afinidade e avidéz. Essa afinidade pode ser alcançada através de múltiplas interações da proteína ligante a vários subsítios em um único glicano ou de uma proteína que tenha múltiplos sítios ligantes interagindo com os vários sítios apresentados pelo glicano (RUDD *et al.*, 2004).

As interações células-carboidratos não são restritas somente aos fenômenos patológicos, mas também são cruciais para as operações do sistema imune (RUDD *et al.*, 2004, Mc GREAL *et al.*, 2004).

Vários estudos demonstraram que as lectinas de plantas são potentes mitógenos. No entanto uma mesma lectina pode atuar como mitogênica, comitogênica e antimitogênica, dependo das condições experimentais (KILPATRICK, 1999 e MURAILLE *et al.*, 1999). Presumivelmente as lectinas ditas mitogênicas ligam-se ao complexo receptor de células T e assim podem promover um sinal coestimulador positivo conduzindo a produção de interleucina 2 (IL-2), conduzindo a proliferação celular (GAULTON & WILLIAMSON, 1994).

As diferenças no reconhecimento de glicoproteínas presentes na superfície de linfócitos podem direcionar a via estimulatória da mitogênese ou permitir a identificação seletiva de subpopulações, pelas lectinas de plantas (BARRAL-NETO *et al.*, 1992), que têm sido usadas para caracterizar subpopulações de leucócitos (KILPATRICK, 1999 e SHERBINI, *et al.*, 2000).

Várias lectinas vegetais demonstraram ser mitogênicas para linfócitos. *Phaseolus vulgaris*, *Canavalia ensiformis*, *Canavalia brasiliensis*, e *Dioclea virgata* estimulam células T. A lectina *pokeweed* (PWM) é seletiva para linfócitos humanos do tipo B. Dentre as lectinas da subtribo Diocleinae, *Dioclea rostrata* e *Cratylia floribunda* ativam a produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) (BARRAL-NETO *et al.*, 1992).

A ligação de *peanut agglutinin* (PNA), também pode ser correlacionada com a diferenciação ou ativação de linfócitos T e a capacidade de apresentação de antígenos por macrófagos e células B (SHERBINI *et al.*, 2000) e *Artocarpus heterophilus* (jacalina), específica para resíduos de N-acetil-D-glucosamina é fortemente mitogênica para linfócitos TCD4+ (KABIR, 2000).

Algumas lectinas mitogênicas tais como Con A, PHA, PSA e LCA e a lectina não mitogênica de gérmen de trigo (WGA) podem induzir a secreção de citocinas como IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-12 (MURAILLE *et al.*, 1999). Especificamente a IL-12, que é produzida por vários tipos celulares, apresenta atividade pró-inflamatória, estimula a produção de IFN- $\gamma$  o qual ativa os macrófagos e aumenta sua eficácia na eliminação de patógenos. Alguns estudos têm apontado essa citocina como crucial nos eventos iniciais da resposta imune contra organismos patogênicos diversos (MURAILLE *et al.*, 1999)

Lectinas vegetais e seus efeitos nas pragas que afetam culturas agrícolas.

Os insetos constituem a maior e mais diversificada classe do reino animal. Essa classe é constituída por organismos que parasitam plantas ou colheitas e animais diversos. Os besouros da ordem *Coleoptera* e as larvas *Lepdoptera*, além de causarem danos físicos às sementes que estão no campo ou são estocadas, predispõem as espécies vegetais ao ataque de fungos e bactérias.

A melhor forma de controlar essas pragas tem sido a utilização de produtos químicos. No entanto, esses produtos apresentam poder de contaminação, intoxicação e geram desequilíbrio ecológico (SAITO & LUCCHINI, 1998) e resistência (GALLO *et al.*, 2002).

Algumas pesquisas *in vitro* demonstraram que as lectinas presentes nos vegetais podem protegê-los contra a ação de predadores e de pragas (FITCHES *et al.*, 1997; FITCHES & GATEHOUSE, 1998, MACHUKA *et al.*, 2000).

A vicilina, proteína de defesa, presente em cultivares do feijão de corda (MACEDO *et al.*, 1993 e 1995) e algumas proteínas tóxicas como a canatoxina

isolada da *Canavalia ensiformis* (CARLINI *et al.*, 1997) e a zeatoxina isolada de *Zea mays* (MACEDO *et al.*, 2000), demonstraram atividade inseticida contra o bruchídeo *Calosobruchus maculatus*.

Lectinas específicas para resíduos de manose demonstraram efeito inibitório sobre o desenvolvimento de estágios parasitários das ordens *Coleoptera*, *Lepidoptera* e *Homoptera* (FOISSAC *et al.*, 2000). Essas proteínas podem ligar-se a receptores carboidratos presentes nas células intestinais de insetos e causar danos (FITCHES *et al.*, 1997; FITCHES & GATEHOUSE, 1998; FITCHES *et al.*, 2001).

Algumas lectinas de plantas, quando incorporadas em sementes artificiais, demonstraram efeito inibidor sobre o desenvolvimento de *C. maculatus* (MURDOCK *et al.*, 1990; HUESING, 1991). No entanto poucas proteínas demonstraram efeito sobre o desenvolvimento da espécie *Z. subfasciatus*, (CARDONA *et al.*, 1990; MACEDO *et al.*, 2002).

As células do intestino médio dos insetos predadores de plantas são revestidas por uma membrana organizada num arranjo de quitina (4-13%), embebida numa matriz composta de proteínas e carboidratos (21-51%) e resíduos de N-acetil-D-glucosamina, denominada de membrana peritrófica (RICHARDS & RICHARDS, 1997). Uma vez ligada a essa membrana, uma lectina pode interferir no processo de digestão e absorção do inseto (ZHU *et al.*, 1996) ou no processo de formação da membrana e penetrar nas microvilosidades permitindo a destruição do intestino pelo material de ingesta (HARPER & HOPPINKS, 1997; HARPER *et al.*, 1998).

Recentemente, muitos trabalhos foram produzidos detalhando o mecanismo de ação de algumas das lectinas experimentadas contra vários tipos de insetos fitopatógenos.

A ligação da GNA e Con A com as microvilosidades e a membrana peritrófica permitiu a passagem de proteínas do intestino para os túbulos de *Malpighi*, na larva do tomate, *Lacanobia oleracea*, sugerindo que ambas as lectinas parecem exercer efeitos sistêmicos nessa praga (FITCHES *et al.*, 2001). Essas larvas apresentaram alterações na atividade enzimática das

microvilosidades intestinais (FITCHES *et al.*, 1997; FITCHES & GATEHOUSE, 1998), quando alimentadas com dieta semi-artificial.

A lectina LOA causou grande mortalidade e cessação da alimentação em larvas de *Maruca virata*, da ordem *Lepidoptera* (JACKAI & RAULSTON, 1998 e MACHUKA *et al.*, 1999). As larvas receberam dietas artificiais e foram observadas quanto aos parâmetros: sobrevivência, peso, inibição da alimentação, pupação e fecundidade. A lectina de *Galanthus nivalis* (GNA) também alterou todos os parâmetros biológicos, observados em parasitas dessa mesma ordem (MACHUKA *et al.*, 1999).

Quando alimentadas em curto e longo período de tempo com dieta semi-artificial contendo as lectinas de *Galanthus nivalis* (GNA) e *Canavalia ensiformis* (Con A) larvas de *Lacanobia oleracea* apresentavam alterações na atividade enzimática das microvilosidades intestinais (FITCHES, GATEHOUSE & GATEHOUSE, 1997; FITCHES & GATEHOUSE, 1998). As larvas que foram alimentadas, por longo tempo, com as duas lectinas, exibiram redução no peso da ordem de 50 a 60%. *In vitro*, foi observado que a Con A se ligava tanto à membrana peritrófica das larvas quanto às microvilosidades, enquanto que a GNA ligou-se mais especificamente a estas últimas estruturas (FITCHES, GATEHOUSE & GATEHOUSE, 1997; FITCHES & GATEHOUSE, 1998 e FITCHES *et al.*, 2001).

A ligação da GNA e Con A com as microvilosidades permitia a passagem de proteínas do intestino para os túbulos de Malpighi da larva do tomate, sugerindo que ambas as lectinas pareciam exercer efeitos sistêmicos na praga (FITCHES *et al.*, 2001).

Larvas de *Ostrinia nubilalis*, a broca do milho, quando receberam dieta artificial contendo a lectina do gérmen de trigo (WGA), por 72 horas, mostraram pouco aumento no peso (HARPER, HOPPKINS & CZAPLA, 1998). A microscopia revelou que, após 24 horas de ingestão da lectina, a membrana peritrófica das larvas apresentava irregularidades em sua morfologia e, em 48 horas, a mesma encontrava-se destruída. A WGA, marcada com peroxidase, foi detectada, principalmente, nas microvilosidades e na membrana peritrófica (CZAPLA &

LANG, 1990), demonstrando que interferiu na formação desta membrana, abrindo acesso nas microvilosidades para que o material de ingesta concluísse a destruição da área (HARPER & HOPPKINS, 1997 e HARPER, HOPKINS & CZAPLA, 1998).

A espécie *Maruca virata*, da ordem *Lepidoptera*, constitui uma importante praga do feijão na África e Ásia (SINGH *et al.*, 1990), contra a qual várias lectinas já foram testadas. As larvas receberam dietas artificiais e foram observados dados relativos aos parâmetros: sobrevivência, peso, inibição da alimentação, pupação e fecundidade. Somente as lectinas de *Listera ovata* (LOA) e de *Galanthus nivalis* (GNA) foram eficazes em todos os parâmetros observados (MACHUKA *et al.*, 1999). A lectina LOA foi a que causou maior mortalidade larval e cessação da alimentação (JACKAI & RAULSTON, 1998 e MACHUKA *et al.*, 1999).

A lectina galactose-específica de *Sphenostylis steneocarpa* (MACHUKA *et al.*, 1999) foi testada em relação à sua interferência sobre o desenvolvimento de *Calobruchus maculatus* e *Maruca virata*. A mortalidade das larvas de *C. maculatus* foi de até 88%, entre 07 e 13 dias, com uma dieta de 0,2-5,0% (peso/peso). O efeito deletério sobre as larvas de *M. virata* somente ocorreu quando essa lectina foi adicionada em uma dose extremamente alta na dieta (MACHUKA *et al.*, 2000).

TRIGUÉROS *et al.*, 2000, observaram uma diminuição do poder inseticida da lectina de *Lathyrus ochrus*, sobre as larvas de *Drosophila melanogaster*, quando associada ao seu açúcar inibidor glucose.

Lectinas de origem vegetal com especificidade para quitina.

Cinco famílias de lectinas apresentam especificidade pela quitina: *Solanaceae*, *Gramineae*, *Amaranthaceae*, *Papaveraceae* e *Urticaceae*. E essas proteínas têm demonstrado efeito sobre o desenvolvimento de organismos que contém este polímero em sua estrutura, tais como fungos e insetos (POWELL *et al.*, 1995, CIOPRAGA *et al.*, 1999; FITCHES *et al.*, 2001).

Essas proteínas são ditas possuidoras de domínio heveína. Uma vez que, possuem unidades estruturais de aproximadamente 40 resíduos de aminoácidos com seqüência similar a da heveína, proteína extraída do látex de *Hevea brasiliensis* constituída de 43 aminoácidos e que possui um único domínio ligante (BROEKAERT *et al.*, 1990). Muito embora as lectinas de *Cucurbitaceae* se liguem a quitina e não apresentem esse domínio heveína (VAN DAMME *et al.*, 1998).

Dessas famílias fazem parte hololectinas como a UDA (*Urtiga dioica*) que inibe o crescimento de fungos (BROEKAERT *et al.*, 1989) e a WGA (aglutinina do gérmen de trigo) que tem sido muito explorada em sua atividade inseticida e demonstrou afetar o crescimento das larvas que atacam o arroz (POWELL *et al.*, 1995) e das que produzem a broca milho (HARPER, HOPPKINS & CZAPLA, 1998).

#### *Talisia esculenta* (St. Hill) Radlk.

Originária da parte Ocidental da Amazônia e bem adaptada ao calor e clima úmido, a planta *Talisia sp* encontra-se distribuída desde nas regiões Norte e Nordeste do Brasil e na região Amazônica da Colômbia, e em países como o Peru a Bolívia, o Paraguai e a Argentina. É uma Sapindaceae de médio porte, que tem como sinônimos botânicos *Sapindus esculentus* e *Sapindus edulis* (St. Hill). Apresenta como nomes populares em português: pitomba, pitomba-rana, olho de boi, pitomba de macaco; em inglês, *pitombeira is the tree* e francês *pitoulier comestible*. Existem aproximadamente 40 espécies do gênero *Talisia*, oito das quais tem frutos comestíveis, sendo as mais importantes *T. esculenta* e *T. oliviformis* (SILVA, 1996).

Essa planta atinge de 9 a 14m, suas folhas são alternadas, com 2 a 5 pares de folhas verde escuras. As flores são pequenas e ocorrem em panículos apicais. Os frutos (Figura 2) são de exocarpo coriáceo marron, dispostos em cachos, atingem de 1.5 a 2.5cm de diâmetro. As sementes, de formato arredondado ou elipsóide, germinam entre 24 e 35 dias. São cobertas por uma

polpa esbranquiçada ou translúcida e adocicada. Uma árvore madura pode produzir cerca de 45kg de frutos anualmente (CLEMENTE & SILVA, 1994 e SILVA, 1996).

Na região Amazônica e no Nordeste essa produção ocorre de dezembro a fevereiro. Onde os frutos são consumidos frescos ou sob forma de sucos. A seiva e as nervuras das folhas são utilizadas como veneno para peixes de água doce. As sementes cozidas, na região Amazônica, servem para o tratamento de diarreias em crianças (VILLACHICA, 1996).

A lectina de *Talisia esculenta* (St. Hill) Radlk e suas atividades biológicas.

A lectina que foi obtida das sementes de *Talisia esculenta* Radlk, é uma glicoproteína, que apresenta em sua estrutura 12 a 18% de açúcares neutros MACEDO *et al.*, 2002.

Os principais estudos sobre essa lectina foram feitos por FREIRE *et al.*, 2001 e 2003; MACEDO *et al.*, 2000 e 2002.

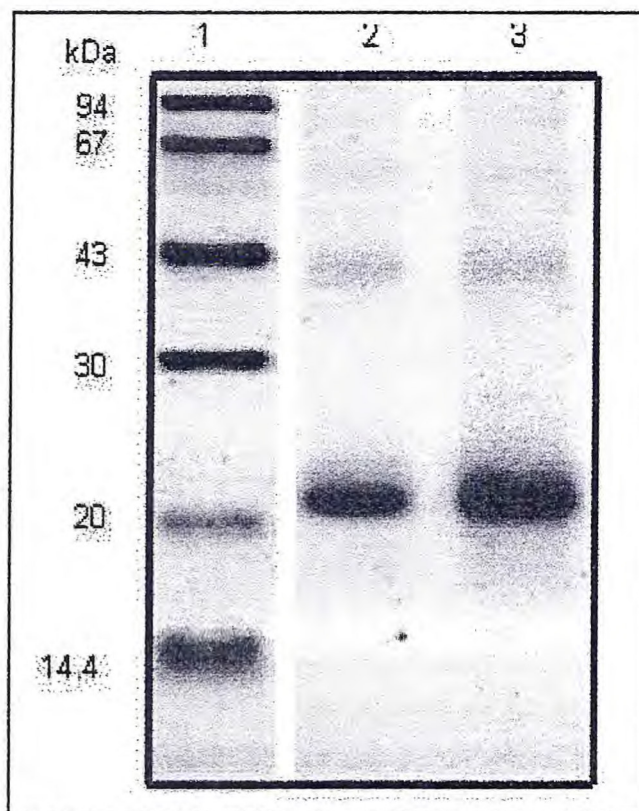
FREIRE *et al.*, 2001 e 2003 realizaram os primeiros estudos bioquímicos dessa molécula. Estes autores encontram uma solubilidade em torno de 40 a 50% da proteína em tampões salinos, em virtude do elevado teor de aminoácidos hidrofóbicos, que ela encerra. Além disso, a mesma requer íons  $\text{Ca}^{+2}$  para exibir atividade biológica. A lectina purificada demonstrou estabilidade na faixa de pH 3 a 9 e em temperatura de 37 a 60°C. As frações obtidas nas cromatografias de exclusão molecular e em coluna de afinidade, quando submetidas a eletroforese PAGE-SDS (Figura 3), mostraram que a TEL consiste de duas subunidades de 20 e 40 kDa, ligadas não covalentemente. Quando a massa molecular aparente foi determinada em presença dos açúcares inibidores manose-glucose, foi encontrado o valor de 40kDa, o que sugere ser esta lectina um dímero de 20kDa. Quatro isoformas foram obtidas quando a TEL foi submetida a recromatografia em coluna de fase reversa. E o pI encontrado para TEL foi de (5,18 a 6,28 subunidade 40kDa e 5,18 a 7,51 para a subunidade de 20kDa).

Nos ensaios de atividade hemaglutinante o extrato bruto das sementes aglutinou todos os tipos os grupos sanguíneos de humanos, apresentando maior especificidade para os grupos A e AB, relativamente ao sangue de animais essa atividade foi mais intensa para eritrócitos de galinha e hamster, embora em menor proporção seja observada aglutinação em eritrócitos de boi, carneiro e coelho. Os monossacarídeos que apresentaram efeito inibitório sobre a TEL foram Manose, glucose e N-acetil-D-glucosamina (MACEDO *et al.*, 2002 e FREIRE, 2003).

A seqüência de aminoácidos das isoformas da TEL não apresentou homologia com outras lectinas obtidas de plantas, relacionadas no banco de dados NCBI-Blast. No entanto, a mesma apresentou homologia com outras proteínas tais como: o inibidor de Kunitz, presente em sementes de *Psocarpus tetragonolobus* (MANEN *et al.*, 1991), o precursor de uma proteína de 21 kDa (ASP) oriunda das sementes de cacau (TAI *et al.*, 1991), os inibidores de alfa-amilase e subtilisina (RAGI) do arroz (OHTSUBO & RICHARDSON, 1992) e as proteínas de reserva precursoras da sporamina A e B (SPRB e SPR1) da batata doce (HATTORI *et al.*, 1997).

Figura 2- Frações de TEL (Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS 12,5%).

1. Marcadores moleculares padrões;
2. Lectina de *T. esculenta* (TEL);
3. Lectina de *T. esculenta* em presença de Ditioteitol (DTT).





Recentemente foram feitos por FREIRE *et al.*, 2001 e 2003; MACEDO *et al.*, 2000 e 2002, alguns estudos relativos à atividade biológica da lectina de *T. esculenta*.

A lectina isolada das sementes de *T. esculenta* induziu a migração de neutrófilos e de células mononucleares quando aplicada nos modelos da bolsa de ar subcutânea e da cavidade peritoneal de camundongos. Essa migração foi afetada pelos açúcares D-manose (80%) e D-glucose (51%). Essa lectina também apresentou efeito edematogênico dose-dependente, com intensidade máxima observada em 4 horas (FREIRE, 2003).

Essa lectina demonstrou interferiu no crescimento de bactérias e causou a inibição do crescimento de fungos fitopatogênicos (FREIRE *et al.*, 2001 e 2003).

Concentrações variando de 0.5-2.0% (w/w) convertidas em sementes artificiais demonstraram efeito inseticida para as larvas de *Calosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus* (MACEDO *et al.*, 2000). Essa proteína exibiu resistência às enzimas digestivas de *C. maculatus* e de *Z. subfasciatus*, até 48 horas de incubação. E o efeito dela sobre o desenvolvimento das larvas dos bruchídeos foi totalmente abolido na presença do açúcar manose, enquanto que a glucose inibiu parcialmente o peso e a sobrevivência dos mesmos (MACEDO *et al.*, 2002; FREIRE, 2003).

Das poucas proteínas que demonstraram efeito sobre o desenvolvimento da espécie *Z. subfasciatus*, essa foi a primeira lectina de planta citada na literatura (MACEDO *et al.*, 2002).

### A resposta Imunológica

O funcionamento do sistema imune animal depende da comunicação entre várias populações e subpopulações celulares, da regulação das respostas no nível genético e das interações específicas na superfície celular, mediadas por agentes regulatórios solúveis.

A resposta imunológica é um processo de acomodação variável, que leva os animais a produzirem células reativas e anticorpos, em resposta a uma grande

variedade de moléculas e de macromoléculas orgânicas, especialmente proteínas. Somente os vertebrados apresentam sistema imunológico complexo, o qual é de importância vital para esses organismos, constituindo o principal meio de defesa, não somente contra agentes infecciosos, como também outros agentes, tais como aloenxertos, hemácias, pólenes, drogas e mesmo a constituintes do próprio organismo nos processos de auto-imunidade. Originalmente, o interesse no papel da imunidade era devido principalmente a seu desempenho contra infecções, mas há muito foi evidenciado que a resposta imunológica pode ser induzida contra uma imensa variedade de substâncias.

### Resposta Inata

O cenário da imunidade inata é constituído pelas barreiras epiteliais, por células leucocitárias (neutrófilos, macrófagos e célula NK), pelas proteínas circulantes (colectinas, pentraxinas e elementos do sistema complemento) e pelas citocinas (IL-1, IL-12, TNF, IFN- $\gamma$ , quimiocinas, etc) (MURAILLE *et al.*, 1999; HOFFMAN *et al.*, 1999).

A imunidade inata utiliza moléculas de reconhecimento para identificar estruturas antigênicas que podem estar presentes em patógenos ou serem inoculadas no hospedeiro, de alguma forma limitando seu poder de invasão (PETERSEN *et al.*, 2001; RUDD *et al.*, 2004).

Os precursores das células dendríticas (CD), apresentadoras de antígeno (APCs), se desenvolvem na medula óssea e vão através da circulação sangüínea para os tecidos, onde se diferenciam e lá permanecem em estado estacionário (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998). Subpopulações dessas células migram para os linfonodos, onde interagem com as populações de células T (HUANG *et al.* 2002, KIM *et al.*, 2003). Continuamente essas células apresentam antígenos nos tecidos (CAMELO *et al.*, 2004).

A interação entre as APCs e os antígenos ou os patógenos é um passo crítico para a produção da imunidade. Alguns produtos específicos de patógenos podem prover a maturação de células dendríticas. Extratos da toxina derivada do

*Vibrio cholerae* pode induzir a maturação de células CD2. Essa toxina estimula a de resposta do tipo  $T_H2$ , *in vivo* (GAGLIARDI *et al.*, 2000) Por outro lado algumas proteínas derivadas de outros microorganismos estimulam a resposta do tipo  $T_H1$ . No entanto, produtos microbianos podem induzir uma diferenciação mais complexa. Essas interações entre patógenos e CDs são mediadas por produtos desses microorganismos e moléculas de reconhecimento específicas ou receptores padrões de reconhecimento (PRRs), tais como: o *Toll-like* (TLR) (BOONSTRA *et al.*, 2003 e GELMAN *et al.*, 2004) e a lectina tipo-C (GADJEVA *et al.*, 2001, van KOOYK & GEIJTENBEEK, 2003).

As células apresentadoras de antígenos expressam uma variedade de moléculas de reconhecimento que permitem a discriminação entre o *self* e o *not-self* e são bem conhecidas por sua habilidade de reconhecer e internalizar antígenos (McGREAL *et al.*, 2004). Dentre esses receptores protéicos, algumas lectinas que compõem sistema imune, estão implicados nesse reconhecimento de carboidratos (GADJEVA *et al.*, 2001).

A maneira pela qual as células apresentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas e células B), fazem o reconhecimento desse material e os internaliza, para apresentação as células do sistema imune adaptativo determinará a qualidade da resposta imune (Mc GREAL, *et al.*, 2004).

O papel das moléculas co-estimuladoras na interação entre as APCs e as células T é crítico para uma eficiente produção de reposta de célula T do tipo reguladora (LOHR *et al.*, 2003) ou efetora (STRAW *et al.*, 2003, MUNN *et al.*, 2004). A ativação das células T requer no mínimo dois sinais. O reconhecimento do complexo peptídeo-MHC pela célula T, que é o sinal 1, sendo o sinal 2 provido pela interação entre as moléculas co-estimuladoras (CROFT, 2003). Essa co-estimulação pode envolver interações de vários pares de receptores e ligantes expressados pelas APCs e células T (ITANO & JENKINS, 2003)

A sinapse imunológica madura entre a célula T e uma APC envolve uma reorganização espacial dos receptores de superfície da célula T e dos ligantes da APC, com ativação do complexo supramolecular TCR-peptídeo-MHCI. Resultando numa interação estável entre as duas células (RUDD *et al.*, 2004).

Alguns fagócitos eliminam invasores através da utilização do sistema fagócito-oxidase (REMICK & VILLARETE, 1996) e ainda produzem citocinas que participam como mediadores da inflamação e reparação teciduais, no sítio aonde se encontra o antígeno (LEVI *et al.*, 2002 e LEVI *et al.*, 2003). Várias citocinas atuam no recrutamento e na ativação de leucócitos, seja amplificando o poder fagocitário dessas células ou estimulando as respostas das células NK e células T (RIEDEMANN *et al.*, 2003).

As moléculas produzidas pela resposta imune inata estimulam a resposta imune adquirida e influenciam sua natureza (FEARON & LOCKSLEY, 1996). Macrófagos ativados por antígenos e pelo IFN- $\gamma$ , produzem substâncias co-estimuladores que proporcionam tanto a ativação das células T quanto a produção de IL-12 (MURAILLE *et al.*, 1999) e isso estimula a liberação de IFN- $\gamma$ , pela célula T. Neste contexto, os produtos da ativação do sistema complemento oriundos da via alternativa fornecem os *segundos sinais* para a ativação das células B e a produção de anticorpos (CARROLL & PRODEUS, 1998).

Resposta Adquirida.

Mediada por anticorpos

A eliminação de antígenos mediada pelos anticorpos requer a participação de mecanismos efetores tais como células fagocitárias e o sistema complemento (FISCHER *et al.*, 1998; CARROLL & PRODEUS, 1998).

A primeira exposição a uma molécula seja através de infecção ou por vacinação, induz a ativação dos linfócitos B virgens (POWRIE & COFFMAN, 1993), que se diferenciam em células produtoras de anticorpos e células de memória (OLCHSENBEIN *et al.*, 2000; ZINKERNAGEL, 2002).

A ligação específica do antígeno às regiões variáveis das moléculas dos anticorpos, induz alterações conformacionais das suas regiões constantes das cadeias pesadas. Essas alterações proporcionam a ligação das regiões do complexo antígeno-anticorpo aos receptores *Fc* e ao complemento e desse modo

desencadeiam as funções efetoras desses anticorpos (DEMPSEY *et al.*, 1996; FISCHER *et al.*, 1998). Que em sua maioria são mediadas pelas regiões constantes da cadeia pesada das imunoglobulinas.

A capacidade de neutralizar é a única função que decorre somente da ligação do antígeno à molécula de anticorpo (DIMMOCK, 1993; JANEWAY, 2001).

As moléculas de imunoglobulina D e M, são receptores de antígenos presentes em linfócitos B virgens, e adicionalmente IgM ativa o complemento pela via clássica (ROOST *et al.*, 1995). Algumas subclasses de IgG, opsonizam partículas e ligam-se aos receptores *Fc* presentes macrófagos e neutrófilos para facilitar a fagocitose e ainda ativam a via clássica do sistema complemento. A IgA é principal classe produzida no sistema imune de mucosa, é secretada para dentro do lúmen dos tratos digestório e respiratório e responde pela defesa nessas vias (MACPERHERSON *et al.*, 2000). Moléculas de IgE ativam mastócitos e eosinófilos quando ligadas aos receptores *Fc* dessas células e respondem às substâncias alergênicas.

Os desafios com antígenos variados estimulam o desenvolvimento de células T auxiliares, notadamente as subpopulações  $T_H1$  ou  $T_H2$ , que liberam citocinas e durante o processo de ativação das células B, induzem a troca dos isotipos de cadeias pesadas (CROIX *et al.*, 1996).

As Citocinas derivadas de  $T_H1$ , tais como IL-2 e IFN- $\gamma$  induzem as células B a produzirem IgG2a, enquanto que citocinas de  $T_H2$  (IL-4 e IL-6) participam da diferenciação e ativação de células B secretoras de IgG1 (POWRIE & COFFMAN, 1993).

Vias de indução da resposta imunológica.

A via subcutânea

Essa é a rota mais frequentemente utilizada para a imunização de animais, pela facilidade de acesso, porque permite a aplicação de grandes

volumes e a absorção lenta do antígeno. Essa via oferece meio para uma melhor disseminação de emulsões, nela o antígeno está livre de algumas interferências, que ocorrem no trato digestório e no respiratório. Além do que a via subcutânea proporciona o desenvolvimento de reação inflamatória.

Algumas pesquisas têm testado diferentes tipos de proteínas (LAUTERSALGER *et al.*, 2003), inclusive lectinas (DANTAS *et al.*, 2000; YOON *et al.*, 2003), que são injetadas no tecido subcutâneo, como imunógenos. No entanto, a grande maioria dos experimentos explora a atividade imunomoduladora dessas proteínas quando são reconhecidamente imunogênicas (ALBUQUERQUE *et al.*, 1999; DANTAS *et al.*, 2000; DUTTA, 2002; TRIPATHI & MAITI, 2005).

A associação KLM-C+KLH (*Viscum album coloratum*) administrada uma única vez produziu uma resposta humoral que exibiu um pico aos 28 dias, declinando suavemente e se manteve até os 70 dias. Quando outro grupo de animais foi imunizado e recebeu dois reforços com intervalo de duas semanas cada a resposta primária foi significativamente elevada, ocorreu um pico no 28º dia e um elevado nível de anticorpos foi mantido até os 70 dias. A análise dos isotipos de imunoglobulinas demonstrou que haviam sido produzidos altos títulos para IgG1, IgG2a e IgG2b (YOON *et al.*, 2001). Essa lectina modulou a resposta humoral para o antígeno KLH.

A via nasal.

Alguns sítios anatômicos tais como as mucosas apresentam-se como uma barreira aos linfócitos e a outras células efectoras, desse modo, nestes locais a imunidade é mediada por anticorpo (PARTIDOS, 2000; DAVIS, 2001; JEPSON *et al.*, 2004).

As mucosas dos tratos digestório e especialmente a do respiratório são as vias de entrada de antígenos e colonização por diversos patógenos (SANSONETTI & PHALIPON, 1999; NUETRA *et al.*, 1999; CLARK & JEPSON, 2003). A indução de imunidade sistêmica e local, nessas vias é um mecanismo

atrativo para a prevenção de infecções (LAVELLE *et al.*, 2001 JEPSON *et al.*, 2004; BIES *et al.*, 2004).

A mucosa nasal é o primeiro ponto de contato do organismo animal com os antígenos inalados. Por conseguinte, a imunização intranasal tem emergido como rota potencialmente promissora para a obtenção de imunidade de mucosa e sistêmica (McGHEE *et al.*, 1999; DAVIS, 2001).

Essa mucosa é relativamente permeável comparada com outras, uma vez que permite a passagem de moléculas de alto peso, oferece um ambiente menos hostil que a mucosa intestinal e como as secreções são limitadas diluem menos os antígenos que são nela administrados (JEPSON *et al.*, 2004). Por outro lado apresenta como desvantagem um baixo tempo de deposição de substâncias, proporcionado pelo intenso *clearance* muco-ciliar cujo tempo médio é de 5 a 10 minutos (MAYRHOFER, 1994; BIES *et al.*, 2004) depois do qual parte desse muco é direcionada a orofaringe.

Histologicamente a mucosa nasal possui um revestimento epitelial colunar ciliado dotado de microvilosidades, que está apoiado sobre uma lâmina própria altamente vascularizada, rica em células imunocompetentes, capazes de induzir prontamente o desenvolvimento da resposta imune (PARTIDOS, 2000).

O sistema imune associado às vias respiratórias pode ser dividido em três grupos de estruturas, que incluem agregados linfóides localizados nas fossas nasais (nasal-associated lymphoid tissue – NALT), na laringe (larynx-associated lymphoid tissue – LALT) e nos brônquios (bronchus-associated lymphoid tissue – BALT) (SMINIA & KRAAL, 1999). Nos murinos, O NALT localiza-se sob o epitélio do trato respiratório, é constituído primordialmente de agregados de células B, com células T dispersas e dotado de centros germinativos bem desenvolvidos (ANDOH *et al.*, 2002), com poucos plasmócitos em volta da mucosa.

A atuação desses agregados linfóides na resposta imune envolve ainda a participação de vasos linfáticos que efetuam a drenagem do excesso de líquidos tissulares do sistema respiratório e os linfonodos que filtram tais líquidos antes que eles retornem à corrente sangüínea. HAYASHI *et al.*, (1991) observaram que a estrutura microvascular e sua correlação com os subgrupos de linfócitos que

predominam no NALT são similares àquelas encontradas nas tonsilas e nas placas de Peyer.

O NALT exibe notáveis similaridades com as placas de Peyer do intestino, embora apresente diferenças no padrão de migração celular/linfóide e nas propriedades de ligação das *high endothelial venules* (HEV) (KUPPER *et al.*, 1992). Segundo GIANNASCA *et al.*, 1997, as células M do NALT são caracterizadas pela presença de diferentes receptores de superfície celular, ricos em glicoconjugados, que podem influenciar tanto na apreensão quanto na resposta imunológica para antígenos inalados. Podendo permitir a captação de antígenos direcionados ao tecido linfóide nasal através do uso de lectinas (DAVIS, 2001).

O desenvolvimento do sistema linfóide associado à mucosa do trato respiratório parece ser um evento precoce na vida neonatal de um organismo animal. Estudos histológicos feitos por HAMELEERS *et al.*, 1989, acerca do desenvolvimento pós-natal do NALT em ratos revelaram a existência de pequenos acúmulos de linfócitos T e raras células não linfóides logo após o nascimento. Em torno de 10 dias de idade, verificou-se a presença de áreas com distintas células T e B, bem como vênulas de endotélio alto (HEV), linfócitos intraepiteliais, macrófagos e células dendríticas. Possivelmente, estes achados indiquem que o uso da mucosa respiratória como rota para a obtenção de resposta imune eficaz contra antígenos estranhos possa ser feito em indivíduos bem jovens.

Nas imunizações intranasais os principais sítios responsivos estão nos linfonodos cervicais posteriores (ANDOH *et al.*, 2002).

A administração de um antígeno numa mucosa pode conduzir a resultados conflitantes (DAVIS, 2001). Segundo PARTIDOS (2000), o balanço entre a imunidade e a tolerância está na dependência da natureza do antígeno, da sua interação como o sítio ativo da mucosa e de alguns fatores tais como o uso de adjuvantes, a frequência e a dimensão da dose e a genética do hospedeiro.

Após uma imunização intranasal, o antígeno é captado pelas células M, passado para as células linfóides, presentes na lâmina própria da submucosa, sítio de processamento e apresentação. Isso resulta na ativação de linfócitos T que auxiliam no desenvolvimento da resposta humoral elaborada pelas células B



(WU, 1997; WU & RUSSEL, 1997). Muitos antígenos têm predileção pelas células M, dentre eles as enterotoxinas do *Vibrio cholerae* (CT) e *E. coli* (LT), alguns vírus e bactérias enteropatogênicos (MÄKELÄ *et al.*, 2000).

HIROI *et al.*, 1998, estudaram a expressão das células T de mucosa em camundongos e sugeriram que o NALT é caracterizado por ser um meio no qual Th0 pode formar T<sub>H1</sub> ou T<sub>H2</sub>. Entretanto, na passagem nasal observou-se uma predominância de T<sub>H2</sub>, com apenas algumas células do tipo T<sub>H1</sub>.

A resposta do tipo T<sub>H1</sub> é caracterizada pela produção das citocinas IL-2 e IFN- $\gamma$  e a estimulação de células T citotóxicas. Na resposta do tipo T<sub>H2</sub> são produzidas as citocinas IL4-IL-10, na qual a maturação de células B e a produção de anticorpos (MÄKELÄ, 2000).

A interação entre um antígeno, as células M dispostas no revestimento epitelial da mucosa nasal e o NALT dependerá de uma variedade de fatores e, em particular, da natureza física desse antígeno, na forma de partícula ou solução, da sua dose e da frequência do contato (SMINIA & KRAAL, 1999). Pequenas quantidades de antígenos parecem ser suficientes para induzir as respostas sistêmica e local em algumas espécies animais NALLY *et al.*, 2001.

Os antígenos ao serem instilados nas narinas podem ser encontrados em diferentes apresentações farmacológicas tais como pós, suspensões ou soluções na forma de partículas ou gotículas de tamanhos variados (DAVIS, 2001). Grandes partículas passam aceleradamente na parte anterior dos turbinados e seguem em direção à cavidade nasal posterior, enquanto que as pequenas são mais facilmente depositadas nessa mucosa. Essa deposição ocorre na camada de muco, a qual é completamente removida pelos cílios em intervalos de 5 a 10 minutos, daí direcionada para a orofaringe e em seguida repostada por muco fresco secretado pela mucosa (MAYRHOFER, 1994).

Antígenos solúveis são hábeis em penetrar no epitélio nasal e interagir com as células dendríticas, macrófagos e linfócitos e intraepiteliais. Em seguida, ocorre movimentação de linfócitos, através da drenagem de líquidos tissulares, para os linfonodos cervicais, e destes para os posteriores, onde haverá expansão clonal e aumento da população de linfócitos capazes de responder ao estímulo original

(WU & RUSSEL, 1997). O resultado na captação de antígenos solúveis ou particulados poderá ser a produção de uma resposta da mucosa (local e sistêmica) ou o desenvolvimento de tolerância (SMINIA & KRAAL, 1999).

É importante considerar que os antígenos administrados por via nasal podem ser, em parte, deglutidos e atingir a mucosa oral. Para minimizar essa condição, McGHEE *et al.* (1999) sugerem que os animais sejam anestesiados antes do procedimento vacinal. No entanto PICKETT *et al.* (2000), consideraram que a redução do volume instilado pode conferir maior poder de acesso às narinas.

EYLES *et al.* (1999) e BARAS *et al.* (1999) registraram que o uso de antígenos particulados pela via intranasal produzia resposta humoral mais forte que os mesmos antígenos sob a forma solúvel. No entanto OLSZESWSKA *et al.* (2000) encontraram níveis de anticorpos relativamente altos utilizando antígenos solúveis, mas respostas baixas quando administraram antígenos particulados no sítio nasal.

GALLICHAN & ROSENTHAL (1995) observaram que a imunização de camundongos pela via nasal com um vetor expressando a glicoproteína B de *Herpes simplex* induziu a resposta imune de mucosa e conferiu proteção contra o desafio. Os mesmos autores observaram que esse tipo de imunização também induziu resposta no trato genital dos animais.

Foi observado que a imunização intranasal com uma cepa de *Streptococcus pneumoniae* inativada pelo calor gerou produção de imunoglobulina A detectada nas fezes, sugerindo uma ligação entre o sítio de indução (nasal) com o sítio efetor (intestinal) (HVALBYE *et al.*, 1999). Curiosamente, quando esse mesmo vetor foi inoculado por via oral, não houve a detecção de IgA nas fezes.

A imunização intranasal é considerada mais efetiva do que a via oral em relação à produção de resposta mucosa mais precoce e mais efetiva (WU, 1997; WU & RUSSEL, 199; DAVIS, 2001). Além disso, o NALT e seus linfonodos satélites podem manter memória imunológica por longo período. A conversão, diferenciação e maturação dos isotipos de IgA em células secretoras de imunoglobulina A, pode ocorrer antes que elas deixem o NALT (DAVIS, 2001).

Peptídios sintéticos (WU, 1997, WU & RUSSEL, 1997, e lectinas LAVELLE *et al.*, 2000, LAVELLE *et al.*, 2001), apresentaram-se mais imunogênicos pela via intranasal do que pela via oral. E assim a imunização nasal pode ser mais efetiva que a oral, na produção de resposta mucosa mais precoce e mais efetiva (DAVIS, 2001).

A literatura exemplifica como a administração de antígenos intranasal pode conduzir a uma resposta em sítios distantes. HORDNES *et al.* (1997), DUPUY *et al.* (1999) e HVALBYE *et al.* (1999) demonstram que a administração de antígenos por via nasal pode resultar em melhores níveis de IgA intestinal do que a própria imunização pela via oral. Esse efeito pode ser atribuído à dificuldade na distribuição do antígeno nos sítios intestinais e a possível degradação da estrutura do imunógeno no meio ácido estomacal.

McCLUSKIE & DAVIS (2001), trabalhando com imunizações oral e nasal, detectaram níveis de IgA em secreções nasal, vaginal, pulmonar, salivar e intestinal e em amostras fecais.

Mesmo assim, pouco se conhece sobre a manipulação de antígenos solúveis na cavidade nasal (DAVIS, 2001).

Algumas lectinas de plantas podem ligar-se especificamente nas células epiteliais das mucosas e assim sendo conduzir um antígeno, ou por si só elicitar uma resposta imune LAVELLE *et al.*, 2000.

Essas lectinas de plantas são altamente imunogênicas quando administrados pelas rotas oral e nasal e podem eficientemente estimular as respostas imunes sistêmicas e de mucosa LAVELLE *et al.*, 2000, LAVELLE *et al.*, 2001. E embora que não sejam conhecidos os receptores aos quais elas se ligam na mucosa nasal, sabe-se que eles são determinantes dessa imunogenicidade LAVELLE *et al.*, 2000.

Substâncias administradas na via oral foram retidas no muco e assim puderam ser absorvidas de modo mais eficiente (LEHR *et al.*, 1991; LEHR, 1994; HUSSAIN *et al.*, 1997). Contudo foi observado que na mucosa oral, resíduos de carboidratos presentes no muco poderiam interagir com lectinas, impedito seu acesso à célula alvo (JEPSON *et al.*, 2004).

A lectina do tomate (TL) ligou resíduos de N-acetil-D-glucosamina presentes no muco intestinal de ratos e na superfície dos enterócitos desse animal (LEHR *et al.*, 1992).

Algumas pesquisas demonstraram que, a absorção intestinal de substâncias nas mucosas pode ser afetada pelo tamanho, carga e hidrofobicidade da molécula (MANTIS *et al.*, 2000) e pela acessibilidade do seu receptor determinada pela localização do mesmo dentro da camada de muco (FREY *et al.*, 1996; MANTIS *et al.*, 2000).

Estudos de histoquímica mostraram que as lectinas de *Ulex europeus* 1 (UEA-1), específica para resíduos  $\alpha$ -L-fucose, ligou-se quase que exclusivamente a células M de placas de Peyer de camundongos; enquanto que, *Sambucus nigra* (JEPSON *et al.*, 1996), *Viscum album* (SHARMA *et al.*, 1996) seletivamente se ligaram às células M e aos enterócitos de humanos.

GIANNASCA *et al.*, 1997, demonstraram que lectinas administradas pela via intranasal em hamsters possuíam seletividade por células M. Possivelmente a presença de glicoconjugados nessa mucosa poderia permitir a ligação de lectinas. De acordo com JEPSON *et al.*, 2004, carboidratos da superfície das células M podem ser reconhecidos por lectinas.

As lectinas de *Maackia amurensis* tipo II (MAL II) e *Ricinus communis* (RCA-1), na forma solúvel se ligaram a células M e aos enterócitos de coelhos igualmente. Sob a forma de partícula de 120nm a lectina de *Ricinus communis* (RCA-1), falhou em se ligar a qualquer uma dessas estruturas (MANTIS *et al.*, 2000).

*In vivo* foi observado que, marcadores histoquímicos tais como a biotina, o isotiocinato de fluoresceína (FITC) e a peroxidase (HRP) foram seletivamente transocitados para dentro de células M de camundongos quando associados a lectina UEA-1 (CLARK *et al.*, 1995).

LAVELLE *et al.*, 2000, investigaram a imunogenicidade da toxina do cólera da OVA e de algumas lectinas em camundongos, pelas rotas oral, nasal e subcutânea. Os animais foram imunizados nos dias 01, 14 e 35 do experimento, com uma dose de 10 $\mu$ g dessas proteínas em 30 $\mu$ L de PBS, instilados 15 $\mu$ L em

cada narina. Cada grupo recebeu PBS, OVA (grau V), aglutinina do gérmen de trigo (WGA) e *Lycossensicum esculentum* (LEA), específicas para N-acetil-D-glucosamina; *Ulex europeus* (UEA-I), específica para fucose; *Phaseolus vulgaris* (PHA), especificidade para açúcares complexos *Mistletoe lectin* (ML-1), galactose específica e CT (toxina do cólera). Após as três imunizações dos animais com OVA, foram detectados baixos títulos de anticorpos específicos para OVA, no soro. A lectina ML-1, galactose específica, foi fortemente imunogênica. No entanto a administração de 10µg/dose dessa lectina, pela via oral causou mortalidade e afetou o peso dos animais, demonstrando sua toxicidade. Somente na dose subtóxica de 1µg essa lectina demonstrou imunogenicidade. Muitas lectinas são tóxicas ou imunogênicas, mas não se conhece o efeito de repetidas doses (CLARK *et al.*, 2000).

A lectina LEA mostrou ser imunogênica pela via oral e também estimulou tanto a resposta sistêmica quanto à de mucosa quando administrada pela via intranasal. Após uma única dose foi registrada alta concentração de anticorpos para esta lectina na via nasal, mas isso não foi conseguido com a administração da lectina WGA de mesma especificidade. LAVELLE *et al.*, 2000, não encontraram correlação entre a especificidade dessas lectinas e a sua imunogenicidade.

#### Efeito Adjuvante de algumas lectinas

Várias pesquisas experimentais, realizadas ao longo de 60 anos, registraram no campo da imunologia, a utilização de adjuvantes como moléculas ou substâncias capazes de reter antígenos particulados ou solúveis nos sítios de inoculação e amplificar a resposta imunológica direcionada a um antígeno (AUDIBERT & LISE, 1993; GRUPTA *et al.*, 1993; BOMFORD, 1998; SCHIJNS, 2000). Muito embora os mecanismos moleculares e celulares *in vivo* envolvidos e o modo de ação dessas moléculas, ainda estejam totalmente elucidados (SCHIJNS, 2000; SINGH & O'HOGAN, 2003).

De acordo com MATZINGER (1994), sinais oriundos de células estressadas ou lesadas, iniciam uma resposta imune. Esses sinais também

podem provir de infecções, traumas, hipóxia, etc, mas não de células apoptóticas (GALLUCCI *et al.*, 1999). Nesse contexto, proteínas que induzem lesão ou estresse, particularmente atuam como chaperonas para antígenos, desse modo aumentando o aprisionamento e a capacidade de apresentação dos mesmos pelas células apresentadoras de antígenos (SUTO & SRIVASTAVA, 1995; COLACO, 1998).

Efeitos na musculatura tais como necrose das fibras e edema do tecido intersticial, associados a um grande influxo celular têm sido observados em algumas horas após o uso da maioria dos adjuvantes, incluindo hidróxido de alumínio e óleos minerais (WIEDERMANN *et al.*, 1991; YAMANAKA *et al.*, 1992). As respostas imunes podem ser proporcionalmente relacionadas às lesões teciduais. Essa habilidade de lesionar, por indução de uma reação local no sítio de injeção pode ser partilhada pela maioria das substâncias usadas como adjuvantes (SCHIJNS, 2000).

Diferentes classes de adjuvantes podem elicitar respostas do tipo  $T_H1$  ou  $T_H2$  em camundongos, e embora os mecanismos relativos a elas, não estejam esclarecidos, a ativação seletiva de diferentes tipos celulares da imunidade inata e de seus receptores é aventada como uma possibilidade (ROMANI *et al.*, 1997). As interleucinas IL-1 e IL-12 foram identificadas como sinais essenciais e suficientes juntamente com TCR e IL-2 para ativar células T CD4 e CD8 (CURTSINGER *et al.*, 1999).

Algumas lectinas de plantas têm mostrado capacidade de induzirem a síntese específica de anticorpos contra a ovoalbumina e outros antígenos através de diferentes vias de aplicação.

Lectinas com diferentes especificidades, tais como a ricina, a ML-1 e UEA, tem demonstrado potencial como adjuvantes ou carreadores devido a capacidade de ligação aos carboidratos presentes nos diferentes tipos celulares (CLARK *et al.*, 1995).

ALBUQUERQUE *et al.*, 1999, demonstraram que a jacalina demonstrou efeito adjuvante nas respostas primária e secundária humorais ao TNP e ao antígeno constituído de epimastigotas do protozoário intracelular *Trypanosoma*

*cruzi*. E a despeito dos adjuvantes clássicos CFA e IFA, essas substâncias não causaram lesões no sítio de inoculação.

As lectinas de *Artocarpus heterophyllus*, jacalina e artocarpina independentemente da sua especificidade por carboidratos, aumentaram a resposta humoral para a OVA (DANTAS *et al.*, 2000).

LAVELLE *et al.*, 2001, testaram o poder adjuvante para a OVA, utilizando imunizações intranasais, com as mesmas lectinas que eles investigaram a imunogenicidade (WGA, UEA-I, ML-1, LEA e PHA) e a toxina do *Vibrio cholerae* (CT). E observaram que a lectina MI-1, estimulou a produção de altos títulos de anticorpos anti-OVA, no soro e nas secreções nasais de camundongos, demonstrando elevado poder adjuvante na mucosa nasal. No entanto, sua alta toxicidade inviabiliza o seu uso clínico. No entanto, a administração das lectinas WGA, UEA-I, LEA e PHA em associação com a ova não resultou em um aumento significativo de anticorpos específicos.

Os mais potentes adjuvantes de mucosa hoje conhecidos são as toxinas (CT e LT) produzidas por bactérias que fazem a colonização de mucosa. Camundongos imunizados com a toxina do cólera (CT) apresentaram respostas imunes do tipo  $T_H1$  e  $T_H2$  (PIZZA *et al.*, 2001).

Os Ixodidas parasitas das espécies domésticas.

Existem no mundo cerca de 825 espécies de carrapatos, adaptadas a diferentes ecossistemas, nos quais residem seus hospedeiros. Esses artópodos pertencem à ordem *Ixodida* composta por espécies cosmopolitas, as quais várias parasitam animais de produção zootécnica, de companhia ou de guarda.

No Brasil existem registros de sete gêneros de Ixodidae, dentre os quais estão os gêneros *Boophilus sp* (CANESTRINI, 1887) (EVANS *et al.*, 2000) e *Rhipicephalus sp* (LATREILLE, 1807) BELLATO *et al.*, 2003.

O gênero *Boophilus sp* foi introduzido no Brasil, com o gado trazido pelos primeiros colonizadores portugueses e o *Rhipicephalus sp*, veio provavelmente com os colonizadores europeus no século XVI.

A espécie *B. microplus* (Figura 4) parasita preferencialmente os bovinos, no entanto pode se fixar em outros ruminantes e eqüinos (KLOMPEN *et al.*, 1996). Esse carrapato se desenvolve entre os paralelos 32° Norte e 32° Sul e tem destacada importância nos países da América Latina, África e Oceania.

Todo o seu desenvolvimento se completa em um único hospedeiro em no máximo 38 dias, no Nordeste brasileiro, e se constitui de uma fase parasitária sobre a pele do animal e outra não parasitária, que acontece no solo. Essa fase não parasitária tem início, quando as teleóginas ou fêmeas ingurgitadas, se desprendem da pele do hospedeiro para realizarem a postura dos seus ovos no ambiente. Os ovos são postos aos milhares, em massas, aderidos uns aos outros. Quando essa fêmea esgota a dinâmica de conversão de alimento em ovo, se afasta da massa, sendo denominada quenógena, e morre em seguida (EVANS *et al.*, 2000).

Geralmente, *B. microplus* forma grandes colônias nos animais, que sugam grande volumes de sangue, provocando anemia microcítica, discrasia sangüínea, edemaciação. As perfurações deixadas na pele, oriundas da introdução da probóscida, juntamente com as contaminações secundárias da pele por outros agentes, tais como larvas de moscas varejeiras, desvalorizam o couro, para comercialização (WIKEL *et al.*, 1996).

Essa espécie é incriminada como vetor dos protozoários, *Babesia bovis* (SOARES *et al.*, 2000a) e *Babesia bigemina*, e da bactéria *Anaplasma marginale* agentes da Tristeza Parasitária Bovina (WILLADSEN & JONGEJAN, 1999), de vírus (HAGLUND & GÜNTHER, 2003), borrelias (SOARES *et al.*, 2000b; ANGUITA *et al.*, 2003; PAL & FIKRIG, 2003 e HENGGE *et al.*, 2003) e riquetsias (JENSENIUS *et al.*, 2004) que podem ser inoculados nos bovinos e nos humanos no ato de sucção de sangue.

Através da sua saliva neurotoxinas também podem ser inoculadas e causar sintomas neurológicos, febre, fraqueza, placas cutâneas (GORDON & GIZA, 2004), bem como efeitos cardiovasculares (CAMPBELL *et al.*, 2004).

A espécie *Rhipicephalus sanguineus* vulgarmente conhecida como "carrapato marrom do cão" (Figura 5) vive nos cães domésticos das áreas urbanas



do Brasil e apresenta elevada adaptação aos domicílios, independente da permanência dos caninos nesses ambientes (RIBEIRO *et al.*, 1997; LABRUNA *et al.*, 2000).

Além dos caninos, esse parasita pode alimentar-se no homem (HARRISON *et al.*, 1997), em aves, répteis e em outros mamíferos (FERNANDES *et al.*, 2001). Experimentalmente, o coelho pode ser uma fonte de alimento para todos os estágios dessa espécie (SARTOR *et al.*, 1996).

Nos hospedeiros caninos esses carrapatos, fazem sua fixação entre as mais diversas dobras da pele (axilas, pescoço, períneo na face interna das coxas) e ainda no tecido inter-ungular, ouvido externo e na região periocular RIBEIRO *et al.*, 1997; causando dermatites de graus variados (Mc-GINLEY-SMITH & TSAO, 2003). Nas infestações maciças podem ser encontrados parasitas e lesões que se distribuem por toda a superfície corporal (BELLATO *et al.*, 2003, GONZALEZ *et al.*, 2004).

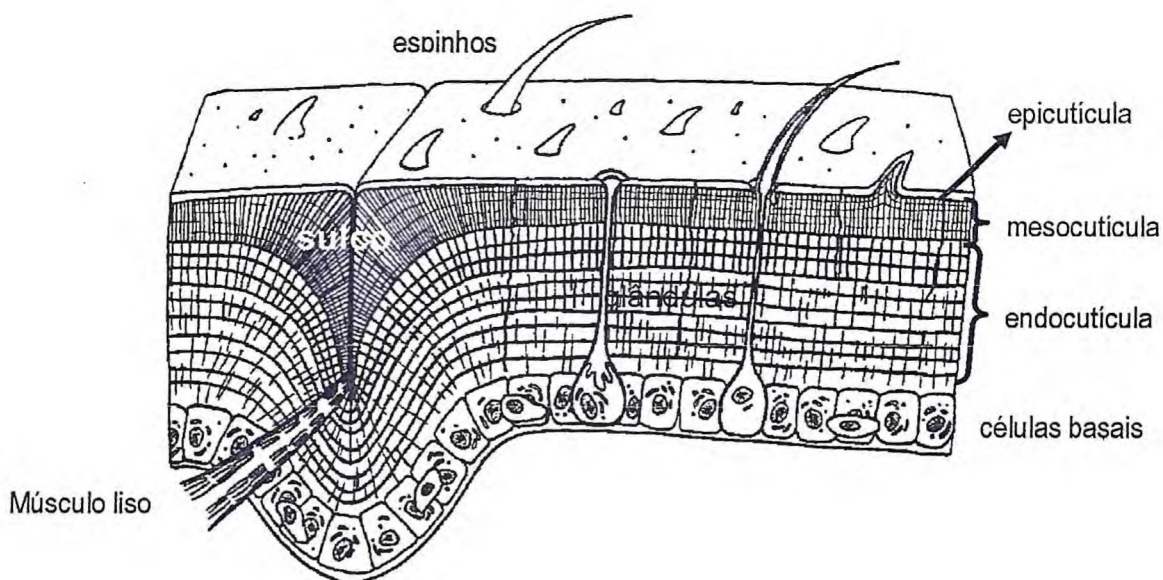
O ciclo biológico do *R. sanguineus* utiliza três hospedeiros e esse parasita, nas algumas áreas endêmicas é capaz de completar até 2,5 gerações por ano (CRUZ-VAZQUEZ & GARCIA-VASZQUEZ, 1999). Cada estágio após a sucção de sangue abandona o hospedeiro, para realizar uma muda no ambiente (KOCH, 1982) e após cada desprendimento, esses estágios procuram lugares protegidos, sombrios e com pouca ventilação. Subindo em paredes, muros arbustos, árvores e mobílias domiciliares, permanecendo quiescentes até a próxima muda (SONENSHINE, 1993).

*R. sanguineus*, comprovadamente é o vetor de algumas doenças fatais para caninos, geradas por agentes tais como bactérias do gênero *Ehrlichia* (BREITSCHWERDT *et al.*, 1998, ANDEREG & PASSOS, 1999); espiroquetas do gênero *Borrelia* (SOARES *et al.*, 2000) e protozoários do gênero *Babesia* (CACCIÒ *et al.*, 2002). Além de ser transmissor da riquéstisia *R. rickettsii* (JENSENIUS *et al.*, 2004) bioagente da febre maculosa, zoonose letal para caninos e para o homem.

Essa espécie através de sua saliva induz paralisia flácida e eczema seco em cães (LEMOS *et al.*, 1997 b) também em leporinos e roedores seus hospedeiros opcionais.

O tegumento dos *Ixodida* embora semelhante aos de outros artrópodes possui estrutura e atividade variadas. O exoesqueleto cuticular é secretado a partir da epiderme e é constituído de três camadas acelulares (Figura 6). A epicutícula, de aproximadamente 4 $\mu$ m, da qual fazem parte algumas ceras e parafinas (SOBBHY, *et al.*, 1994), a exocutícula, composta de quitina e esclerotina, proteína que confere rigidez a esta camada, e a endocutícula, a qual, apesar de ser a mais espessa, é flexível e se compõe de proteínas variadas e também de quitina (ESTRADA-PEÑA, 1993). Essa cutícula responde pela resistência do exoesqueleto às adversidades ambientais e aos banhos acaricidas (WILLIS, 1999; CSIKÓS *et al.*, 1999).

Figura 3 - desenho esquemático do tegumento dos *Ixodidas*.



De modo geral, a cutícula dos carrapatos é muito hidrofóbica, contendo apenas traços de proteínas hidrossolúveis, e as proteínas que estão nas partes

sujeitas à distensão são básicas, em sua maioria (HACKMAN, 1982). Nessa estrutura as associações moleculares são mantidas principalmente pelas ligações hidrofóbicas e pelas pontes de hidrogênio. No entanto, cutículas com mais proteínas ácidas têm muito mais conteúdo em quitina (HACKMAN & GOLDBERG, 1987). Por conseguinte, a arquitetura e a estabilidade das estruturas cuticulares, são determinadas pelas características de ligação das proteínas presentes, com a quitina (HAMODRAKAS *et al.*, 2002).

Estudos de ultraestrutura mostraram que, numa fêmea de carrapato completamente ingurgitada, as camadas do tegumento consistem de uma epicutícula e duas procutículas ou endocutículas interna e externa, tais camadas formam uma estrutura lamelar achatada que congrega um grande número de poros dilatados (DILLINGER & KESEL, 2002). Esse estágio é capaz de consumir uma grande quantidade de sangue em relação ao seu peso e isso somente é possível, devido às características da estrutura cuticular (ICONOMIDOU *et al.*, 1999, 2001).

A quitina é um polissacarídeo nitrogenado, que está presente tanto na exocutícula quanto na endocutícula, desses parasitas em quantidade abundante. Esse carboidrato confere grande poder de resistência à cutícula, embora as partes esclerotizadas e, portanto, mais rígidas não sejam formadas por este polímero (ESTRADA-PENÃ, 1993). Esse polímero nos carrapatos apresenta-se sob a forma de microfibrilas embebidas numa matriz proteíco-lipídica (DILLINGER & KESEL, 2002). Cujo teor varia entre as várias espécies de carrapatos e de acordo com o sexo. As fêmeas adultas em geral, apresentam mais elevado teor que os machos. As espécies *B. microplus* (Ixodidae) e *Argas robertsi* (Argasidae) apresentam respectivamente 3.8% e 9.9% desse polissacarídeo na sua cutícula respectivamente (HACKMAN & GOLDBERG, 1985). Na literatura não foram encontrados dados relativos a espécie *R. sanguineus*.

A grande maioria dos insetos parasitas de plantas apresenta uma membrana denominada peritrófica, no intestino médio organizada num arranjo de quitina (4-13%), embebida numa matriz composta de proteínas e carboidratos (21-51%) e resíduos de N-acetil-D-glucosamina (RICHARDS & RICHARDS, 1997).

Contra a qual muitas lectinas específicas para resíduos de manose e/ou ligantes de quitina tem sido testadas (POWELL *et al.*, 1995; FITCHES *et al.*, 1997; HARPER *et al.*, 1998; FITCHES & GATEHOUSE, 1998; FOISSAC *et al.*, 2000; FITCHES *et al.*, 2001).

Naturalmente, sob condições ambientais adequadas a oviposição dos carrapatos começa após o segundo dia de desprendimento da teleógina de seu hospedeiro. Fêmeas de *Boophilus microplus* chegam a 50% do volume total da postura entre o 4º e 5º dias, e do 9º ao 14º dias já estão finalizando (AMARAL, 1993). Uma vez iniciada a postura a fêmea morre num período de 2 a 15 dias, embora, esse tempo possa ser alterado, dependendo das condições ambientais.

Existe uma correlação linear entre o tamanho e o peso das fêmeas (PF) e sua capacidade de oviposição (BENNET, 1974). Por essa razão a determinação do peso de conversão máximo em ovos (PMOT) nas várias espécies de ixodídeos é relevante para os testes de eficácia de produtos sejam eles comerciais ou em desenvolvimento (BORGES *et al.*, 2001).

O peso da quenógena (PQ) quando comparado ao peso inicial da fêmea (PI) reflete a capacidade de conversão dos nutrientes em ovos, o que repercute diretamente nos índices de eficiência reprodutiva (IER) e nutricional (IEN) (AMARAL, 1993). A capacidade de conversão do peso dos carrapatos em ovos varia sazonalmente, animais inoculados com um mesmo número de larvas em diferentes estações climáticas, demonstram que a resposta fisiológica do animal ao encurtamento do fotoperíodo proporciona um aumento na população de carrapatos no período de outono/inverno (BARRIGA *et al.*, 1995).

Normalmente o período de incubação (PI) de *B. microplus* fica entre 22 a 26 dias, contados a partir do início da postura. A taxa de eclosão larval é subjetiva e pode ser feita através do cálculo do número de ovos eclodidos (FURLONG, 1990).

Fêmeas ingurgitadas (AMARAL, 1993) e larvas (FERNANDES *et al.*, 2001) não alimentadas são os dois instares de escolha para os testes de sensibilidade a moléculas *in vitro*. O teste mais comum é o da imersão de

teleóginas numa formulação líquida do produto teste, nos tempos de 2 ou 5 minutos.

Pesquisas *in vitro* relativas aos parâmetros biológicos da fase não parasitária do carrapato *B. microplus*, no Brasil, foram feitas por COSTA (1982) BITTENCOURT *et al.*, 1990 GLÓRIA *et al.*, 1993 e BORGES *et al.*, 2001.

GLÓRIA *et al.*, 1993, verificaram que para espécie *B. microplus*, o período de pré-postura foi de 2 a 4 dias, o período de postura pode variar de 5 a 18 dias, a massa total de ovos postos esteve entre 87,1 a 225,3 mg. O peso da quenógena (PQ) acontece quando termina o período de postura e variou de o período de incubação dos ovos ficou entre 24° e o 27° dia e o percentual de eclosão esteve quase sempre em 100%.

BORGES *et al.*, 2001 demonstraram que existe uma variação sazonal na conversão do peso das fêmeas de *B. microplus*, e essa variação se reflete no IER das mesmas. Isso decorre da alteração da resistência dos bovinos a este carrapato dentro das diferentes estações climáticas.

No Brasil foram feitos vários estudos relativos à espécie *R. sanguineus*, em condições de laboratório. COELHO (1993) estudou parâmetros da oviposição em temperatura de  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ , com umidade relativa  $80\%\pm 10\%$  e BECHARA *et al.*, 1995 estudaram a capacidade de alimentação e os aspectos reprodutivos de fêmeas mantidas sob condições controladas. Entretanto o estudo mais detalhado acerca dos parâmetros biológicos dessa espécie, foi feito por BELLATO & DAEMON, 1997, que mantiveram as fêmeas teste em três diferentes temperaturas e analisaram os parâmetros biológicos da fase não parasitária relativos a incubação dos ovos e o período de eclosão.

BELLATO & DAEMON, 1997, encontraram que, o período de pré-postura de *R. sanguineus* durou de 2 a 4 dias, o período de postura variou de 9 a 18 dias e a massa total de ovos postos alcançou de 67,40 a 156,00mg ( $114\pm 4,22$ ). Terminado o período de postura as fêmeas apresentaram peso residual ou peso da quenógena (PQ) variando de 25,60 a 52,60mg ( $35,60\pm 1,0$ ). Esses autores notificaram que na temperatura de  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ , com umidade relativa  $80\%\pm 10\%$  e

escotofase, o período de incubação dos ovos de *R. sanguineus*, esteve entre 18-20 dias ( $18,24 \pm 0,12$ ) e o período de eclosão variou de 7 a 12 dias ( $9,48 \pm 0,136$ ).

### O controle das populações de *Ixodidas*.

Existem alternativas para controlar as populações dos carrapatos no ambiente dos bovinos, baseadas em seu ciclo. Esse controle pode ser feito através da rotação de pastagens ou utilizando insetos predadores (SAMISH & REHACEK, 1999) e nematódeos entomopatogênicos (SAMISH & GLAZER, 2001). Outros métodos incluem, a introdução de raças de bovinos geneticamente mais resistentes e o uso de carrapaticidas (WITCHEY-LAKSHMANAN, 1999; FRISCH, 1999). No entanto, no Brasil, a resistência do *B. microplus*, a esses produtos tem sido notificada em praticamente todas as regiões criadouras e com os mais variados tipos de moléculas (GLÓRIA *et al.*, 1993, FLAUSINO *et al.*, 1995; MERLINI & YAMAMURA, 1998; FURLONG, 1999). As populações de *R. sanguineus* também são controladas por acaricidas químicos (ESPUNY *et al.*, 1994, ESTRADA-PEÑA & ASCHER, 1999, FRANC & CARDIEGUES, 1999), e é comum a utilização desses produtos nas instalações dos animais.

Surgiu nas últimas décadas, um novo advento na criação intensiva de animais, a vacinação do gado utilizando-se antígenos obtidos de células intestinais de *Boophilus microplus* (la FUENTE *et al.*, 1998, MULENGA *et al.*, 2000, GARCIA-GARCIA *et al.*, 2000); WILLADSEN (2001), de VOS (2001). No entanto, o uso isolado dessas vacinas, nas regiões do Brasil que são endêmicas para o carrapato, não mostrou eficácia (RODRIGUEZ *et al.*, 1995 a, b; MASSARD *et al.*, 1995). Sendo, portanto, indicadas aplicações táticas de acaricidas conjuntamente com a finalidade de se evitar os picos populacionais desse parasita nas épocas mais quentes do ano (BROWN & PALMER, 1999; WILLADESEN, 2001, TRIMNELL *et al.*, 2002). A vacinação experimental de animais de consumo com antígenos de células do intestino de carrapatos (WILLADSEN, 1993) ou com vitelina, proteína de reserva, formada por um complexo de glicopeptídeos (Mr 44-107 kDa) (CANAL *et al.*, 1995), tem mostrado induzir a produção de anticorpos

direcionados para oligossacarídeos presentes nessas proteínas e que esses anticorpos poderiam então ligar-se a glicoproteínas não relacionadas, através dos mesmos determinantes oligossacarídeos. Isso explica porque anticorpos poderiam se ligar a glicoproteínas presentes na membrana das células intestinais e destruí-las (TELLAM *et al.*, 2002).

Nas últimas décadas também foram isolados alguns antígenos de *R. sanguineus*, candidatos a vacinas (PRUETT, 1999; MULENGA *et al.*, 2000; WILLADSEN, 2001; GUDERRA *et al.*, 2002). Experimentalmente alguns estudos demonstraram que as células intestinais desse carrapato também podem ser imunogênicas e manipuladas por engenharia genética (WANG & NUTALL, 1994; WILLADSEN, 1993 e 1999; SZABÓ & BECHARA, 1997), muito embora ainda não existam resultados concretos.

DAVEY *et al.*, 2001, verificaram que o produto da fermentação do actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa*, nas concentrações 0.0167%, 0.05% e 0.15% (de ingredientes ativos), demonstraram influência significativa sobre a massa de ovos e o percentual de eclosão das fêmeas de *B. microplus*. A média da massa de ovos produzidos pelas fêmeas do grupo controle foi de 155mg, enquanto que os grupos tratados com o spinosad spray nas doses de 0.0167%, 0.05% e 0,15% produziram massa de ovos de 130, 98 e 73mg respectivamente. O percentual de eclosão para cada tratamento foi respectivamente de 93,4±0,8; 84,7 ±2,0; 58,2± 3,6 e 53,9 ±3,6. A única lectina, até então utilizada em testes de sensibilidade *in vitro* de carrapatos, apresenta toxicidade para animais de laboratório e foi isolada da alga marinha *Solieria filiformis*, específica para manana. Essa proteína mostrou efeito significativo sobre parâmetros biológicos das fêmeas do carrapato do boi *Boophilus microplus*, tais como a redução no peso total da massa de ovos, no período de postura, no peso da quenógena e nos índices reprodutivo e nutricional. Essa foi a primeira lectina utilizada em teste de sensibilidade *in vitro* contra uma espécie de carrapato (NASCIMENTO, 2003).

Não existem relatos na literatura sobre o uso de moléculas protéicas isoladas de vegetais ou de algas sobre os sobre os parâmetros biológicos dos

carrapatos dos caninos, bem como os registros sobre sua composição bioquímica são muito escassos.



### 3. OBJETIVOS GERAIS.

Avaliar a resposta humoral e a ação adjuvante da lectina *Talisia esculenta* (Radlk) administrada em duas vias distintas, subcutânea e nasal em camundongos.

Avaliar os efeitos da lectina *Talisia esculenta* Radlk sobre os parâmetros biológicos de teleóginas dos carrapatos *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1785) e *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1807), e sua ligação à cutícula dessas espécies.

#### 3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliação do efeito da lectina de *Talisia esculenta* na síntese de imunoglobulinas (IgG, IgM, IgA) através de ELISA.

Avaliação dos efeitos da lectina da semente de *Talisia esculenta* Radlck, sobre os seguintes parâmetros biológicos das teleóginas: peso total da massa de ovos (PMOT); peso da quenógena (PQ) e os índices de eficiência reprodutiva (IER) e nutricional (IEN).

Detectar o(s) possível(is) sítio(s) de ligação da lectina de *Talisia esculenta* na cutícula das teleóginas do *Boophilus microplus* (CANESTRINI, 1785) e *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1807), utilizando essa lectina conjugada a FITC.

#### 4. MATERIAIS

##### Animais Experimentais

Os ensaios de imunogenicidade foram realizados com camundongos Swiss (*Mus musculus*), com idade variando de 7 a 10 semanas, separados em caixas plásticas, com n=5 ou n=10, receberam água e alimento *ad libidum*, durante o período experimental, esses animais foram cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Foram utilizados na avaliação da atividade hemaglutinante da lectina de *T. esculenta* (TEL), coelhos albinos, da raça Nova Zelândia variedade branca, fêmeas, com idade superior a um ano, pesando cerca de 2kg, cedidas pela Química Farmacêutica Gaspar Vianna.

O teste de sensibilidade *in vitro* e de fluorescência utilizaram carrapatos de bovinos (*Boophilus microplus*) e caninos (*Rhipicephalus sanguineus*), obtidos de animais domiciliados na região Metropolitana de Fortaleza, infestados naturalmente.

##### Reagentes Químicos

Metanol, etanol, fosfato monobásico e dibásico de sódio e sulfato de alumínio e potássio foram obtidos da Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brasil. Os demais reagentes, todos de grau analítico foram obtidos comercialmente.

##### Imunógenos e adjuvantes

A ovalbumina grau V, utilizada nos experimentos, os adjuvantes de Freund completo e incompleto foram obtidos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). O Gel de Hidróxido de Alumínio, e os reagentes do tampão fosfato (PBS) 0,1M, pH 7,4, foram obtidos comercialmente no mercado local.

## Sementes de *T. esculenta*

Frutos maduros de *T. esculenta* foram colhidos em cachos e comprados em supermercado da rede local de Fortaleza.

## 5. METODOLOGIA

### Preparo da farinha de sementes de *T. esculenta*.

Os frutos maduros foram descascados e deles retiradas as polpas. As sementes desnudas foram trituradas em liquidificador e em seguida submetidas a moagem fina em moinho para café Braun. A farinha obtida foi delipidada com hexana em temperatura ambiente, e espalhada sobre papel de filtro para a evaporação do solvente. Porções da farinha foram conservadas em frascos hermeticamente fechados em câmara fria a  $-10^{\circ}\text{C}$ , para uso posterior nas análises.

### Análise elementar da farinha de sementes de *T. esculenta*.

Os teores de umidade, fibra bruta, cinzas e lipídios foram determinados conforme a técnica descrita pela A.O.A.C. (1974). O teor de nitrogênio total da farinha foi determinado pelo método de Kjeldahl (BAETHGEN & ALLEY, 1989), o qual foi calculado usando-se o fator de conversão de 6,25. Os valores correspondentes à concentração de carboidratos solúveis foram estimados por diferença.

### Determinação da Proteína Total

O conteúdo de proteínas da farinha de sementes de *T. esculenta* foi determinado pelo método de Kjeldahl, com adaptações para determinar o teor de

nitrogênio protéico através do método colorimétrico descrito por BAETHGEN & ALLEY (1989).

Amostras em triplicata contendo 0,02g de farinha foram colocadas em tubos de mineralização e a elas foram acrescidos 1,5mL de ácido sulfúrico concentrado e 1,1g de mistura sólida composta de sulfato de potássio (para elevar o ponto de ebulição do ácido), selênio e sulfato de cobre (usados como catalisadores, para acelerar a digestão da matéria orgânica) na proporção de 100:10:1. A mistura foi aquecida em digestor até a completa mineralização da amostra. A solução concentrada de sulfato de amônio, produzida dessa digestão foi diluída para 10mL com água grau Mili-Q e utilizada para o ensaio colorimétrico. O nitrogênio total foi estimado com base em uma curva padrão com solução sulfato de amônio. A proteína bruta foi calculada multiplicando-se o teor de nitrogênio encontrado pelo fator 6,25.

#### Determinação do teor de Lipídios

A determinação dos lipídios totais foi feita por extração a quente com N-hexano de acordo com TRIEBOLD, 1946. Amostras de 2 g da farinha, foram colocadas em cartuchos duplos de papel de filtro e estes foram depositados nos extratores de Soxhlet, que foram acoplados a balões previamente secos, desengordurados e tarados. Fez-se a adição da hexana e esses conjuntos foram aquecidos por 8 horas contadas a partir do início do ponto de ebulição do solvente. Decorrido o tempo de extração, o solvente foi parcialmente recuperado e os balões contendo resíduo de solvente e conteúdo lipídico das sementes, foram transferidos, sem contato manual, para dessecador e pesados quando atingiram a temperatura ambiente. O teor de lipídios foi calculado pela diferença entre o peso de cada balão antes e depois da extração, os resultados foram expressos como porcentagem do peso seco.

### Determinação das Cinzas

Para a determinação do resíduo mineral da farinha de *T. esculenta*, 2g da amostra em triplicata, foram acondicionadas em cadinhos de porcelana previamente secos e tarados, os mesmos foram levados à mufla para incineração a 600°C durante 4 horas. Os cadinhos, após decorrido o tempo de calcinação, eram transferidos para dessecador até atingirem temperatura ambiente e em seguida eram pesados. O resíduo mineral foi calculado pela razão entre o peso final e o peso inicial das amostras, expresso em percentual.

### Determinação da Umidade

Para a determinação do teor de umidade três alíquotas de 0,5g da farinha foram pesadas em recipientes secos e tarados, em seguida colocadas em estufa a 105±5°C provida de circulação de ar forçada por 24 horas. Decorrido esse tempo, os recipientes contendo as amostras, foram levados para o dessecador até atingirem a temperatura ambiente e pesados. Esse processo foi repetido até ser verificado peso constante das amostras. O teor de umidade foi calculado pela diferença entre o peso inicial e final, sendo expresso em percentual.

### Determinação da Fibra Bruta

A metodologia de Weende, descrita por SILVA (1990), foi utilizada para determinar o teor de fibras brutas nas amostras. Alíquotas contendo 0,5 g da farinha de *T. esculenta* foram colocadas em tubos para digestão, sendo acrescentadas a elas 100mL de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1,25%, os tubos receberam aquecimento por 30 minutos contado a partir da ebulição do material. Após a digestão ácida, o resíduo sólido foi filtrado em funil de haste porosa, lavado com água destilada quente, adicionado de 100 mL de uma solução de NaOH a 1,25% e outra vez aquecido por 30 minutos contados a partir da ebulição. Concluída a

digestão alcalina, o resíduo restante foi filtrado em um sistema a vácuo, composto por cadinhos adaptados a kitsatos acoplados a uma bomba de vácuo. A lavagem do resíduo sólido final, com água destilada, com álcool etílico duas vezes e com éter etílico, foi feita com auxílio de pressão negativa. Os cadinhos foram levados a estufa a  $105\pm 5^\circ\text{C}$ , com circulação de ar forçada por 12 horas. Decorridas as 12 horas, os cadinhos foram transferidos para dessecador e pesados. A fibra bruta foi calculada como sendo a diferença entre o peso do resíduo das digestões antes da calcinação e o peso do resíduo mineral final. Os resultados foram expressos como percentual do peso seco da farinha.

#### Isolamento e purificação da lectina de *T. esculenta*.

A lectina de *T. esculenta* foi isolada a partir da farinha delipidada em dois passos cromatográficos de acordo com FREIRE *et al.*, 2001. Os procedimentos de isolamento e purificação foram executados no laboratório de Proteínas do Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual de Campinas, de onde foram cedidas alíquotas dessa lectina purificada pelas professoras Maria Lígia Rodrigues Macedo e Maria das Graças Freire Machado.

#### Avaliação da resposta imunológica Humoral.

##### Imunização dos camundongos pela via subcutânea.

Um total de 45 Camundongos foi separado em caixas plásticas em lotes de 05 animais. Cada grupo ( $n=5$ ) recebeu pela via subcutânea, na pele do dorso,  $200\mu\text{L}$  de uma solução contendo as substâncias de cada tratamento. Grupos controle foram formados pelos animais injetados com: 1) PBS 0,1M pH 7,4 e 2) Ovalbumina  $100\mu\text{g}$ +gel de hidróxido de alumínio (60mg/dose). Fizeram parte dos grupos testes os camundongos que receberam: 3) Ovalbumina  $100\mu\text{g}$ /dose 4) TEL

50 $\mu$ g/dose; 5) TEL 50 $\mu$ g+Ovalbumina 100 $\mu$ g/dose; 6) TEL 100 $\mu$ g/dose; 7) TEL 100 $\mu$ g+Ovalbumina 100 $\mu$ g/dose e dois grupos com a lectina associada aos seus açúcares ligantes; 8) TEL 100 $\mu$ g+manose-glucose a 0,1M/dose e 9) TEL100 $\mu$ g+N-acetil-D-glucosamina 0,1M/dose. Após a primeira imunização todos os lotes receberam um reforço no 14° dia e foram feitas sangrias individuais e semanais nos dias 07, 14, 21, 28, 35 e 42 decorridos do experimento.

#### Imunização dos camundongos pela via nasal

A imunização intranasal dos camundongos utilizou a metodologia de LAVELLE *et al.*, 2000. Seis grupos de camundongos (n=5), separados em caixas plásticas, foram submetidos à sangria no plexo retro orbital antes da imunização. Todas as soluções foram preparadas no momento de cada imunização. Os animais receberam alíquotas de 15 $\mu$ L, em cada uma das narinas, tendo sido instilado o volume total de 30 $\mu$ L, com o auxílio de uma pipeta *Hamilton*. Após a primeira imunização foram aplicados dois reforços no 14° e 35° dias decorridos do experimento. As seguintes soluções foram administradas pela via nasal: 1) PBS 0,1M pH 7,4; 2) Ovalbumina 10 $\mu$ g; 3) TEL 10 $\mu$ g; 4) TEL 10 $\mu$ g+Ovalbumina 10 $\mu$ g, dois grupos foram imunizados com solução de lectina associada aos seus açúcares ligantes; 5) TEL 10 $\mu$ g+manose-glucose 0,1M e 6) TEL 10 $\mu$ g+N-acetil-D-glucosamina 0,1M. Os animais foram sangrados individualmente nos dias 07, 14, 21, 28, 35 e 42, contados após a primeira imunização.

#### Colheita dos soros após as imunizações pelas vias subcutânea e nasal

Para a obtenção de sangue total foi puncionado individualmente, o plexo retro orbital de cada animal, utilizando-se pipeta *Pasteur*, antes da imunização e nos dias 07, 14, 21, 28, 35 e 42 após a primeira imunização. Cada amostra de sangue foi acondicionada num tubo de vidro e deixada em estufa a 37°C por uma hora para retração do coágulo. Decorrido esse tempo, as amostras foram

colocadas na bancada em temperatura ambiente após a retração do coágulo, os soros foram recolhidos com auxílio de micropipeta e centrifugados a 1000 x g por 7 minutos, a fim de remover quaisquer debris eventualmente presentes nas alíquotas. Esses antissoros específicos, foram identificados de acordo com o grupo e o número do animal e então mantidos a 4°C, até o momento do uso em teste ELISA.

#### Detecção das imunoglobulinas específicas através de ELISA.

A técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), foi utilizada para detectar e quantificar os anticorpos anti-TEL e anti-OVA, induzidos pelas imunizações dos camundongos nas vias nasal e subcutânea. Empregou-se o método indireto no qual, algumas placas de poliestireno (Nalge Nunc), foram sensibilizadas com uma solução da lectina purificada de *T. esculenta* na concentração de 7,5 µg/poço e outras o foram com Ovalbumina na concentração de 4µg/poço. Essas placas foram incubadas *overnight* a 4°C. Decorrida a etapa de sensibilização, as placas foram lavadas 3 vezes com solução de PBS contendo Tween-20 0.05% (PBS-Tween), em seguida, cada poço recebeu uma solução de caseína a 0,25% em PBS e foram incubadas em estufa a temperatura de 37°C por uma hora. Foram feitas cinco diluições seriadas para os soros do grupo controle e do grupo teste produzidos pelos animais imunizados pela rota nasal e pela via subcutânea. Foram feitas diluições seriadas dos soros, para aqueles oriundos da rota nasal de 1: 25 a 1: 400 e para os originados pela via subcutânea, as diluições foram de 1:638 a 1: 10.000. As placas foram retiradas da estufa, lavadas 3 vezes com solução de PBS-Tween. O conjunto de placas foi novamente incubado *overnight* a 4°C. Terminado o tempo de incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS-tween e procedeu-se a aplicação das anti-imunoglobulinas de camundongos polivalentes conjugadas a peroxidase. Após um período de incubação de 2 horas em estufa a 37°C, as placas foram novamente lavadas 3 vezes com PBS-tween. Em seguida foi colocada a solução cromógena (*o*-Phenylenodiamina Dihidrochloreto) OPD, a reação após o tempo de 20 minutos,



foi parada por adição de ácido sulfúrico 2N e a leitura realizada em leitor de ELISA (Biotecel), absorvância 492nm. Os dados foram organizados em planilha (*excel*), onde a soma das cinco diluições seriadas foi multiplicada por 1000, tendo sido esse valor denominado de escore de ELISA, segundo (VERDOLIN *et al.*, 2001), posteriormente esses escores foram submetidos a análise estatística.

#### Estatística.

Os dados obtidos a partir dos ensaios realizados forma, inicialmente, submetidos aos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnoff, para verificação de normalidade da distribuição, e aos testes de Levene e bartlett, para confirmação da homogeneidade de variância entre os tratamentos. Como os dados resultantes dos ensaios de ELISA não apresentaram distribuição normal e nem homogeneidade de variância, nem mesmo após a transformação logarítmica, radicial ou angular, procedeu-se, então, a análise por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis utilizando-se também o programa estatístico SAS (2000).

#### Obtenção dos carrapatos *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus*.

Fêmeas ou teleóginas dos carrapatos *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus*, ingurgitadas e livres de resíduos de acaricidas, foram manualmente catadas de bovinos e caninos naturalmente infestados, acondicionadas em recipientes plásticos mantidos em isopor contendo gelo reciclável. Em seguida, foram conduzidas para o laboratório de Parasitologia da Faculdade de Veterinária (FAVET) da Universidade Estadual do Ceará (UECE), para serem submetidas ao teste do biocarrapaticidograma ou teste de sensibilidade a produtos *in vitro* (DRUMMOND *et al.*, 1971 e 1973).

## Avaliação dos parâmetros biológicos dos carrapatos *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus*

As teleóginas ou fêmeas ingurgitadas catadas foram lavadas, submetidas à secagem com papel absorvente. Foi feita uma seleção de acordo com (LEITE *et al.*, 1995) que se baseou nos seguintes aspectos físicos: máximo ingurgitamento, motilidade, integridade do idiossoma (corpo), cada fêmea foi separada por ordem decrescente de tamanho, para que fossem formados tratamentos com pesos mais homogêneos (ARANTES *et al.*, 1995). Os parasitas foram mantidos sob temperatura de refrigeração até o momento de início do experimento. Essas fêmeas foram pesadas individualmente em balança de precisão 0,001g e colocadas em uma seringa numerada. Procedeu-se outra seleção que alocou 15 exemplares fêmeas de peso mais homogêneo em cada tratamento. Os tratamentos das teleóginas de *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus*, consistiram de soluções contendo a lectina de *T. esculenta* diluída em tampão fosfato em concentrações que variaram de 4 a 4000 mg/mL. Também foram feitos tratamentos para cada espécie de carrapato com a lectina *T. esculenta* pré-incubada com os açúcares glucose-manose e N-acetil-D-glucosamina na dosagem de 400 $\mu$ g/mL, considerada intermediária. Considerou-se grupo controle as fêmeas tratadas com tampão fosfato (PBS) 0,1M pH 7,4.

Os grupos de fêmeas (n=15) foram imersos durante cinco minutos nas soluções acima citadas. Decorrido o tempo, cada fêmea foi retirada da solução teste, e individualmente enxugadas com papel absorvente, fixadas nos seus respectivos números com fita adesiva dupla face em placas de Petri, devidamente identificadas de acordo com o tratamento e em seguida as placas foram incubadas em câmara para BOD a 27 $^{\circ}$  $\pm$ 1.0 $^{\circ}$ C e umidade relativa 80% $\pm$ 10%. A massa de ovos produzidos, individualmente, foi coletada a cada dois dias, pesada e colocada em tubos tipo *vacutainer*, identificados com o respectivo número da fêmea. Os tubos eram tampados com algodão e colocados nas mesmas condições de temperatura e umidade que a fêmeas. Observações diárias foram feitas para verificar o início da eclosão dos ovos e a estimativa da eclodibilidade.

Ao terminar o período de postura cada fêmea denominada de quenógena, foi pesada.

Deste ensaio foram coletados dados relativos aos seguintes parâmetros biológicos: peso inicial da fêmea ingurgitada ou teleógina (PIF), período de postura (PP), peso da massa de ovos total (PMOT), peso da fêmea no fim da postura (PFF) e os índices de eficiência reprodutiva (IER) e nutricional (IEN) que foram calculados de acordo com BENNETT (1974). O período de postura (PP) foi determinado pelo início da postura até a liberação dos últimos ovos.

Estatística.

Os dados obtidos a partir dos ensaios realizados foram, inicialmente, submetidos aos testes de Sahpiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnoff, para verificação de normalidade da distribuição, e aos testes de Levene e Bartlett, para a confirmação da homogeneidade de variância entre os tratamentos. Os dados resultantes da associação do efeito das concentrações da TEL sobre os parâmetros biológicos das espécies de carrapatos testadas serviram para construir uma curva de regressão cuja equação foi selecionada com base no coeficiente de determinação  $R^2$ .

Ensaio de fluorescência para a detecção da lectina de *T. esculenta* na cutícula dos carrapatos *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus*.

Uma solução de conjugação composta de 1,5 mL de tampão carbonato de sódio, bicarbonato de sódio 0,2 M com pH 9,3 e 0,5mL de etilenoglicol, foi preparada para dissolver 1mg da lectina de *T. esculenta* (TEL), acrescida com seus açúcares inibidores manose e N-acetil-D-glucosamina. Esse conteúdo foi agitado em vortex, acrescido de 0,5mL de solução de 0,05mg de isotiocianato de fluoresceína em etilenoglicol e submetido a agitação por 5 horas a 4°C protegido da luz. Decorrido o período de incubação, separou-se a fração lectina associada a FITC, da FITC não conjugada, através de cromatografia de exclusão molecular,

feita em coluna PD 10 (Pharmacia LKB – 9,0 mL), equilibrada previamente com água Mili-Q saturada com N-butanol a 5%. Ambas frações lectina associada a FITC (pico I) e a FITC (pico II), foram eluídas respectivamente com 3,5mL e 10 mL da solução de N- butanol 5% (PINTO, 2001).

Depois que as lectinas acrescidas dos seus açúcares inibidores foram associadas a FITC, uma alíquota de cada uma delas na concentração de 100 µg/mL foi preparada para posterior uso nas amostras de cutícula oriundas dos carrapatos *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus*, para a detecção da fluorescência nos receptores glicídicos presentes nessa estrutura.

Preparo histológico dos carrapatos para teste de fluorescência.

Fêmeas dos carrapatos *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus*, catadas de seus respectivos hospedeiros bovinos e caninos foram lavadas em água destilada, e guardadas em temperatura de refrigeração até o momento do uso.

Amostras das teleóginas das duas espécies foram sacrificadas e fixadas inteiras em formol a 4% tamponado *overnigth*. Após o período de fixação as peças receberam fenol 4% *overnigth* (U.S. ARMY FORCE, 1974). No dia seguinte os parasitas foram desidratados e embebidos em parafina líquida de acordo com os métodos padrões descritos por JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1983. As peças foram cortadas a 5µm de espessura. Imediatamente antes do teste com as lectinas associadas a FITC, cada lâmina foi desparafinizada e desidratada utilizando-se bateria gradual de álcoois e finalmente rehidratada com água destilada. As lâminas contendo os cortes receberam cerca de 20 µL de cada lectina associada a FITC. Em seguida as lâminas foram incubadas em câmara escura (temperatura ambiente), durante 2 horas. Decorrido este tempo foram lavadas com o respectivo tampão de extração de cada lectina para posterior observação em microscópio com kit de fluorescência Zeiss (filtro FITC 48770, para 450-490 nm).

## 6. RESULTADOS

Análise elementar de sementes de *Talisia esculenta*.

Os resultados da análise elementar de sementes de *Talisia esculenta* adquiridas comercialmente no mercado de Fortaleza, no estado do Ceará, apresentam-se descritos na Tabela 1 e na Figura 7.

Efeito da lectina de *T. esculenta* sobre a resposta imunológica humoral.

Resposta imunológica humoral induzida pela via subcutânea.

Os resultados relativos à imunogenicidade da TEL quando aplicada por via subcutânea encontram-se descritos na Tabela 2 e representados graficamente na Figura 8. Como se pode observar, trata-se de uma proteína notoriamente imunogênica quando aplicada por via subcutânea, em ambas as doses testadas. Aplicada na dose de 100 µg, a TEL desencadeou a produção de imunoglobulinas totais em níveis nitidamente superiores àqueles obtidos após imunização com a mesma proteína em dose de 50µg/dose. A ovoalbumina (OVA 100µg/dose), uma proteína reconhecidamente imunogênica, foi utilizada como controle positivo. As respostas aos três tratamentos descritos foram, em todos os dias avaliados, significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) ao controle negativo, ou seja, à resposta observada nos animais que receberam injeção de PBS.

A resposta primária foi mais intensa com a dose de 50µg/dose de TEL, verificando-se que, os títulos de anticorpos foram crescentes, alcançando um valor máximo em 7 dias, sendo significativamente ( $p < 0,05$ ) superior aos demais. Esta resposta apresentou tendência de queda a partir de então, atingindo níveis significativamente inferiores àqueles devido ao tratamento com TEL 100µg/dose no 14º dia ( $p < 0,05$ ). Em seguida, os títulos decresceram, alcançando um valor

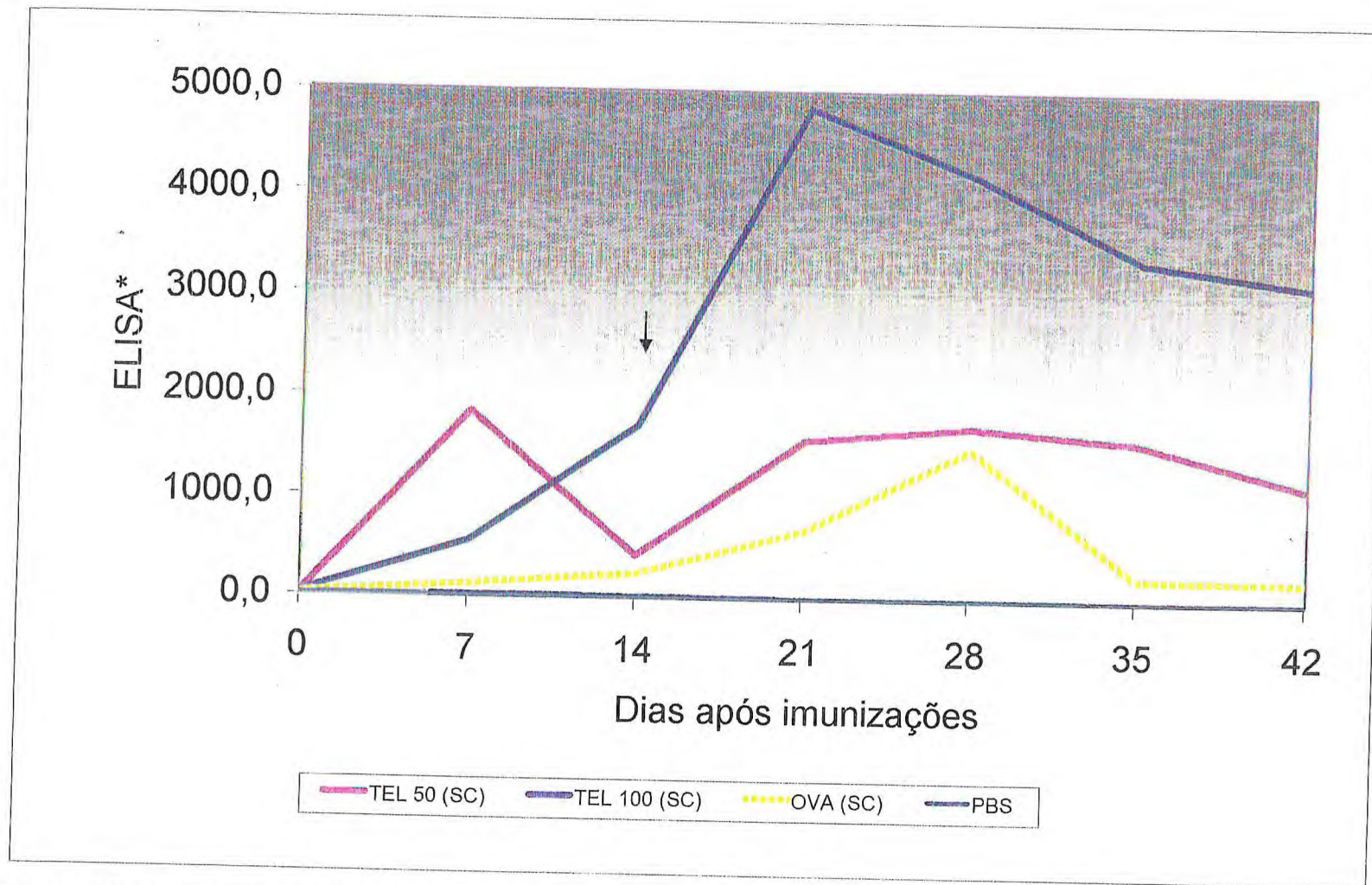


FIGURA 4- Síntese de anticorpos específicos (IgM, IgG, igA) induzida pela lectina de *Talisia esculenta* em camundongos imunizados com 50 $\mu$ g e 100  $\mu$ g pela via subcutânea. Títulos determinados através de escores de ELISA.

mínimo com 14 dias. Já com 100 $\mu$ g/dose de TEL os títulos foram aumentando menos intensamente ao cabo de 7 dias e dos 7 aos 14 dias os títulos foram ainda maiores e o nível alcançado no 14<sup>o</sup> dia foi significativamente superior ao atingido com 50 $\mu$ g/dose de TEL.

Após a segunda aplicação do antígeno, feita aos 14 dias, os valores para os escores de ELISA foram ascendentes para todos os tratamentos, com exceção do controle com PBS. Os perfis das curvas para a TEL 100 $\mu$ g/dose e para a OVA 100 $\mu$ g/dose foram similares, mas com variações nas intensidades dos títulos e nos dias de intensidade máxima que foram nos 21<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dias. Ao longo do período de observação, aos 42 dias, os valores para os escores de ELISA foram significativamente mais elevados para o tratamento TEL 100 $\mu$ g/dose ( $p < 0,05$ ), seguido pelo tratamento TEL 50 $\mu$ g/dose o qual, por sua vez, diferiu significativamente da OVA ( $p < 0,05$ ).

Efeito dos carboidratos ligantes na síntese de anticorpos específicos.

A figura 9 mostra a síntese de anticorpos específicos em resposta à indução provocada por 100 $\mu$ g/dose de TEL associada a carboidratos ligantes (glucose, manose e N-acetil-D-glucosamina). A síntese de anticorpos específicos foi insignificante, quando comparada com a cinética exibida pela indução de anticorpos feita pela TEL 100 $\mu$ g/dose para ambos açúcares ligantes. A tabela 3 mostra que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na síntese de anticorpos específicos entre os açúcares ligantes nos dias 07, 14, 21 e 28.

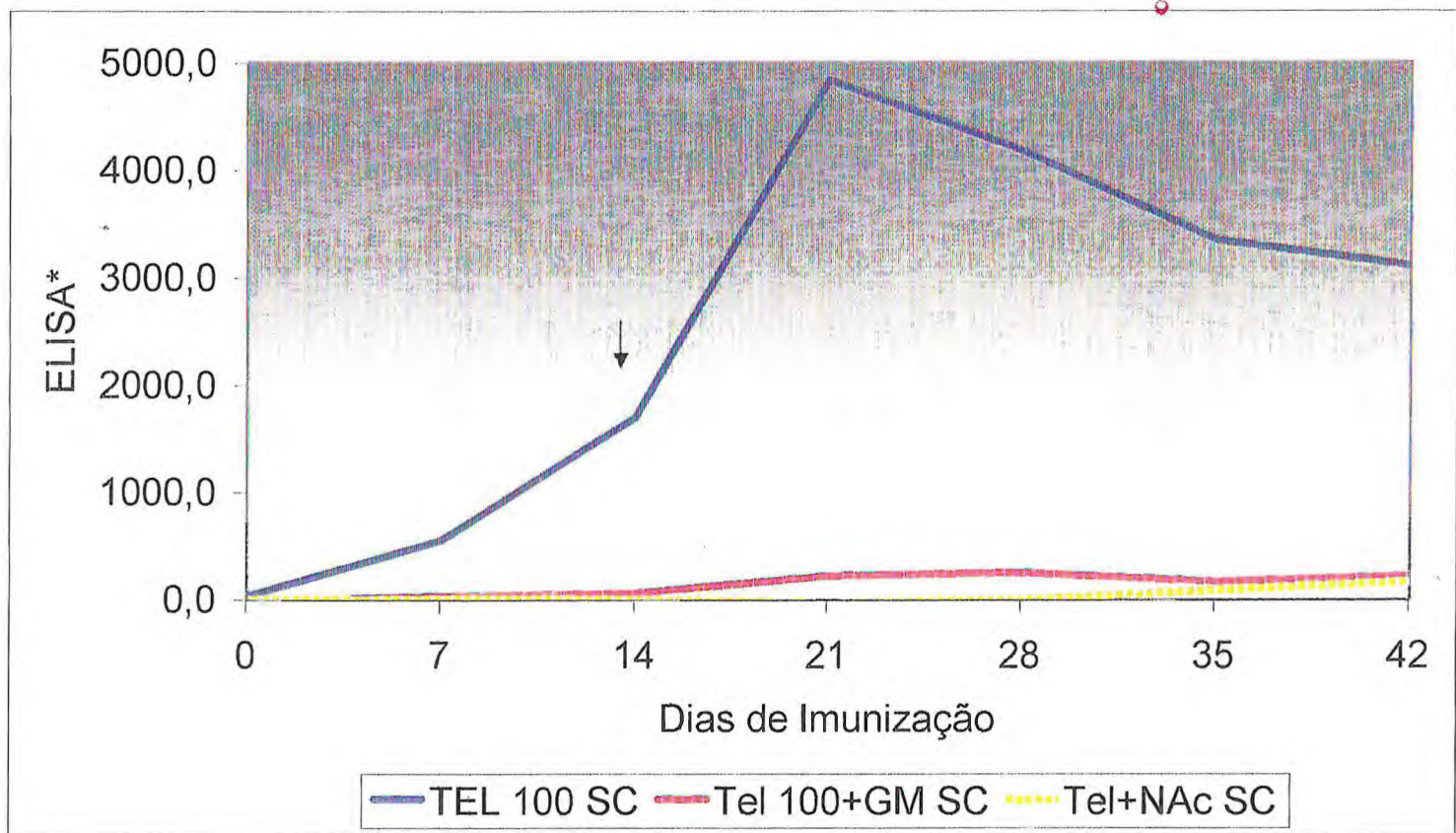


FIGURA 5- Síntese de anticorpos específicos (IgM, IgG, igA) induzida pela lectina de *Talisia esculenta* associação aos açúcares ligantes, em camundongos imunizados com 50 $\mu$ g e 100  $\mu$ g pela via subcutânea. Títulos determinados através de escores de ELISA.



Efeito imunoadjuvante da lectina de *Talisia esculenta* em camundongos imunizados com ovalbumina.

A figura 10 mostra o efeito imunoadjuvante da lectina de *T. esculenta* sobre a síntese de imunoglobulinas específicas induzidas em camundongos por via subcutânea. A TEL foi associada à OVA em duas diferentes dosagens, 50µg/dose e 100µg/dose, e os títulos de anticorpos totais foram comparados com um controle positivo OVA emulsificada em Hidróxido de alumínio (AlOH<sub>3</sub>), um adjuvante utilizado em vacinas comerciais, e um controle negativo representado pela aplicação da OVA.

Os dados apresentados na tabela 6 mostram que a ação adjuvante da TEL na dose de 50 µg foi comparável àquela verificada em relação ao uso do hidróxido de alumínio. Embora a utilização do hidróxido de alumínio como adjuvante tenha proporcionado, no 28º dia, um valor significativamente superior aos demais no título de anticorpos totais ( $p < 0,05$ ), o resultado a partir de 35 dias para os tratamentos OVA emulsificada em Hidróxido de alumínio (AlOH<sub>3</sub>) e TEL50µg/dose associada a OVA 100µg/dose foi semelhante. A aplicação da OVA pura causou um pico na produção de anticorpos no 28º dia, mas ao fim do período experimental sua resposta foi significativamente inferior aos dois tratamentos citados ( $p < 0,05$ ). A OVA associada à TEL na dose de 100µg mostrou uma indução da síntese de anticorpos específicos semelhante a da OVA associada a TEL50µg/dose, na primeira semana, na quinta e na sexta semanas, após imunização. Já a resposta secundária com OVA pura foi significativamente superior nos dias 21 e 28 (Tabela 4).

Os valores da síntese de anticorpos anti-OVA obtidos após imunização com TEL 50µg associada a OVA 100µg são significativamente superiores aos demais tratamentos nos dias 7 e 14 ( $p < 0,05$ ). A utilização da TEL como adjuvante dá origem a uma resposta aparentemente mais precoce: no dia 21, uma semana após a segunda aplicação do antígeno, a produção de anticorpos anti-OVA atinge o seu valor máximo.

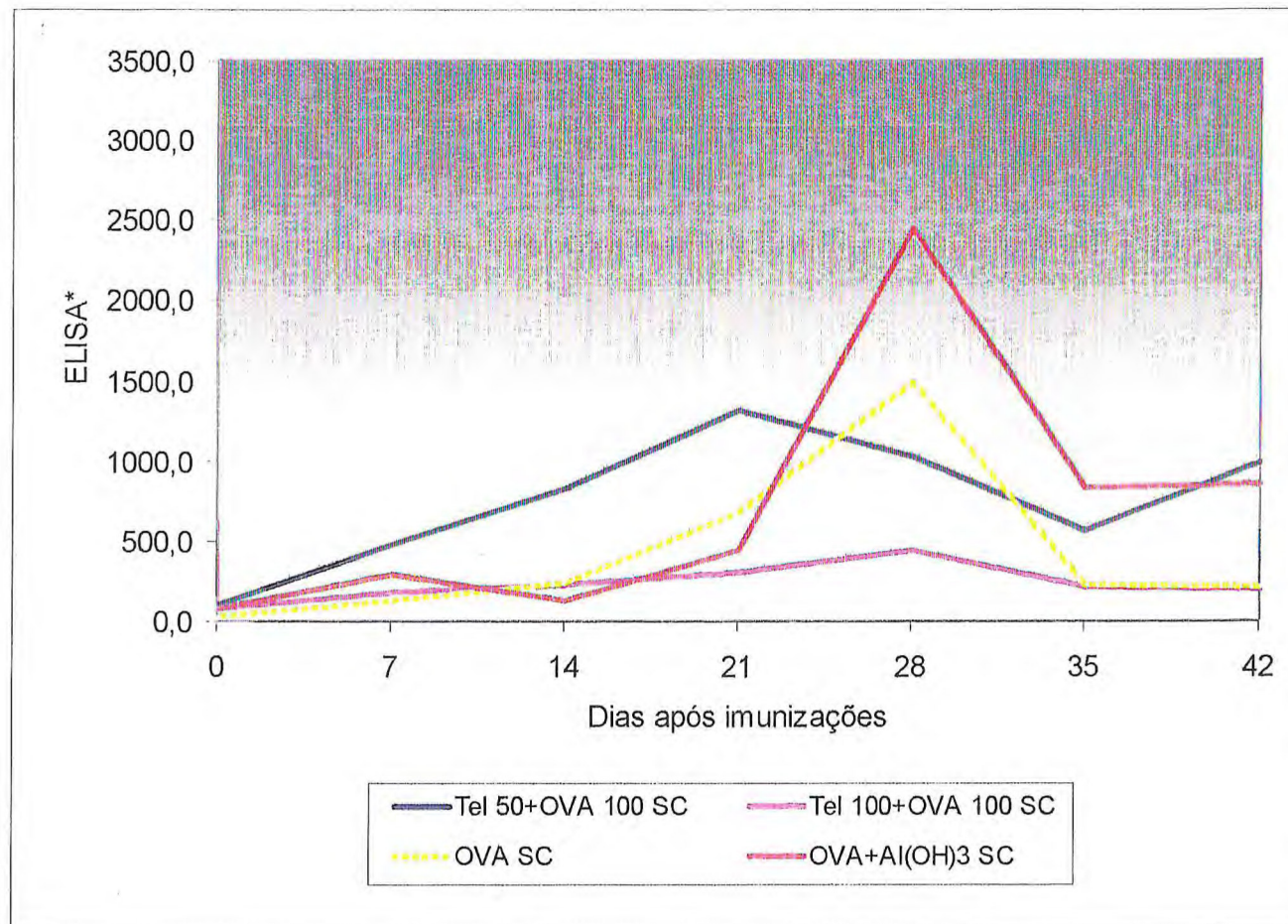


FIGURA 6- Efeito imunoadjuvante da lectina de *Talisia esculenta* sobre a síntese de anticorpos específicos em camundongos imunizados com OVA(100 $\mu$ g), OVA(100 $\mu$ g)+AL(OH)<sub>3</sub>, OVA(100 $\mu$ g)+ TEL(50 $\mu$ g) e OVA(100  $\mu$ g)+ TEL(100 $\mu$ g) pela via subcutânea. Títulos determinados através de escores de ELISA.

A dose mais baixa ( $50\mu\text{g}/\text{dose}$ ) de TEL foi capaz de atuar como imunoadjuvante, amplificando a síntese de anticorpos específicos, em camundongos imunizados com ovalbumina na via subcutânea, a partir da resposta primária.

Resposta imunológica humoral induzida pela via nasal.

A imunogenicidade da TEL quando aplicada por via intranasal encontra-se descrita na tabela 5 e representada graficamente na figura 11.

Embora significativamente superiores aos do controle negativo PBS já no 7º dia, período relativo à resposta primária ( $p < 0,05$ ), os títulos de anticorpos específicos, obtidos por aplicação nasal da TEL, foram significativamente inferiores àqueles observados em relação à aplicação de OVA ( $p < 0,05$ ). A cinética da produção de anticorpos totais também difere entre as duas proteínas. Os resultados mostram tendência sempre crescente para a resposta da síntese de anticorpos anti-OVA, particularmente a partir do 21º dia, até o fim do período experimental, enquanto que a resposta contra a TEL apresentou elevação discreta do 14º ao 35º dia, seguida de tendência à estabilidade a partir deste ponto, sem diferença significativa nas respostas do 28º ao 42º dia ( $p > 0,05$ ).

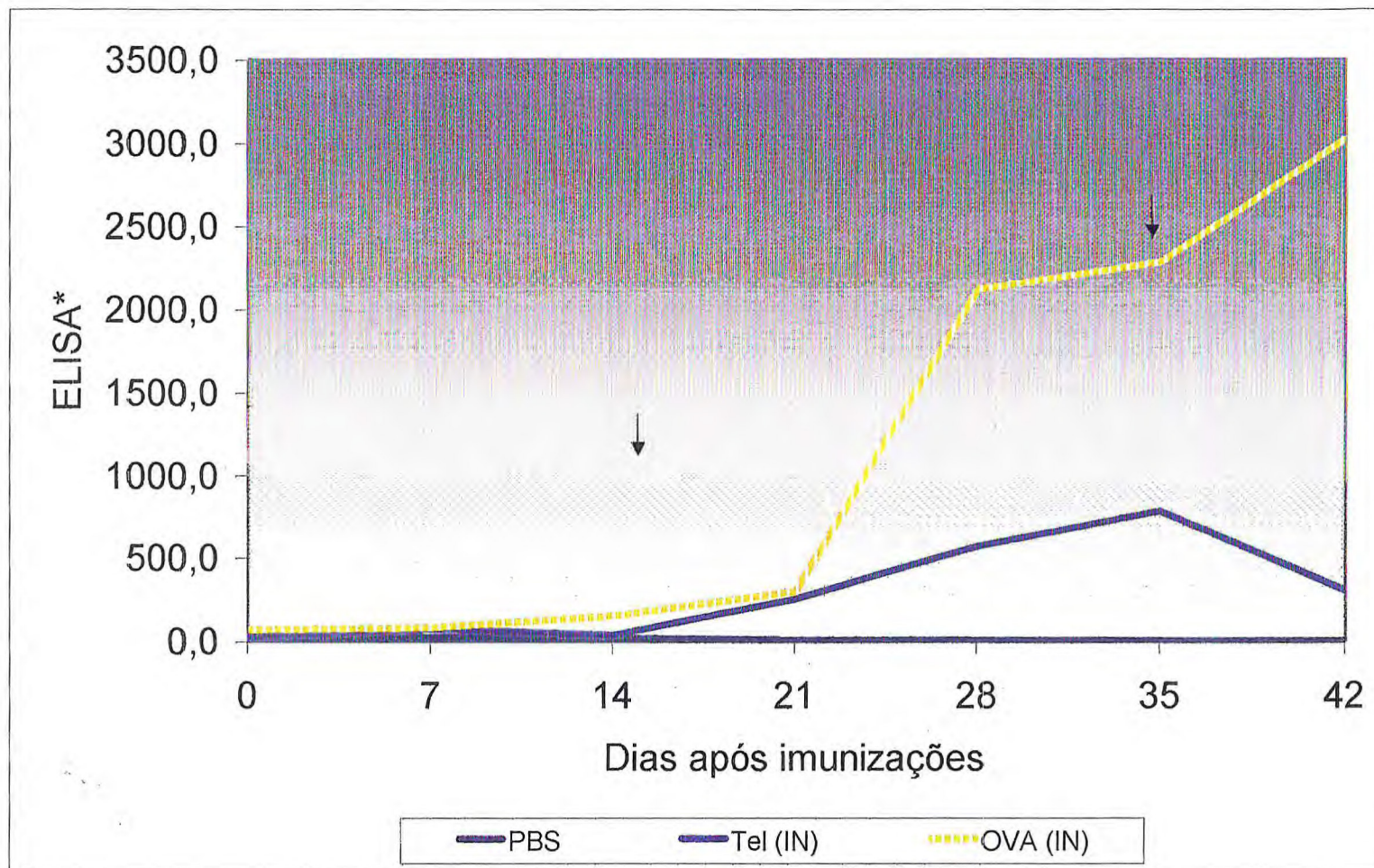


FIGURA 7- Síntese de anticorpos específicos (IgM, IgG, igA) induzida pela lectina de *Talisia esculenta* em camundongos imunizados com 10 $\mu$ g, pela via nasal. Títulos determinados através de escores de ELISA\*.

D-glucosamina, somente apresentou títulos, ainda que baixíssimos, a partir do 21º dia (Tabela 6).

Efeito imunoadjuvante da lectina de *Talisia esculenta* imunizados com a ovalbumina.

Os resultados, demonstrados na tabela 7 e figura 13, sugerem que a TEL não tem qualquer atividade como imunoadjuvante. A resposta em título de anticorpos totais foi quase sempre inferior à da OVA pura ( $p < 0,05$ ), tornando-se semelhante a esta nos dias 35 e 42 ( $p > 0,05$ ). A presença da TEL não teve, portanto, efeito imunoadjuvante sobre a síntese de imunoglobulinas específicas em camundongos imunizados com a ovalbumina por via intranasal.

Efeito da lectina de *T. esculenta* pura ou associada aos seus açúcares ligantes, sobre os parâmetros biológicos dos carrapatos *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus*.

Doses em concentrações variáveis de 4 a 4000 µg/mL de TEL diluída em tampão fosfato (PBS 0,1M, pH 7,4) foram preparadas para imersão das teleóginas de ambas as espécies de carrapatos, no intuito de se observar se o tratamento com a lectina seria capaz de interferir sobre os parâmetros: postura, peso das quenógenas e os índices de eficiência reprodutivo e nutricional. As figuras 14 e 15 mostram respectivamente, as análises de regressão da massa total de ovos postos por fêmeas dos carrapatos *B. microplus* e *R. sanguineus*, em função da concentração de TEL. A equação obtida a partir da linha de tendência foi  $y = 7,6914x^2 - 58,687x + 161,71$ ; significando que, para cada unidade de aumento na variável "x" (logaritmo da dose), ocorreu redução no valor assumido pela variável "y" (massa total de ovos postos) em  $7,6914x^2 - 58,687x + 161,71$  unidades. Para a espécie *B. microplus*, observar que, o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9741 demonstra que a curva representa com significância os dados que se encontram no gráfico de dispersão.

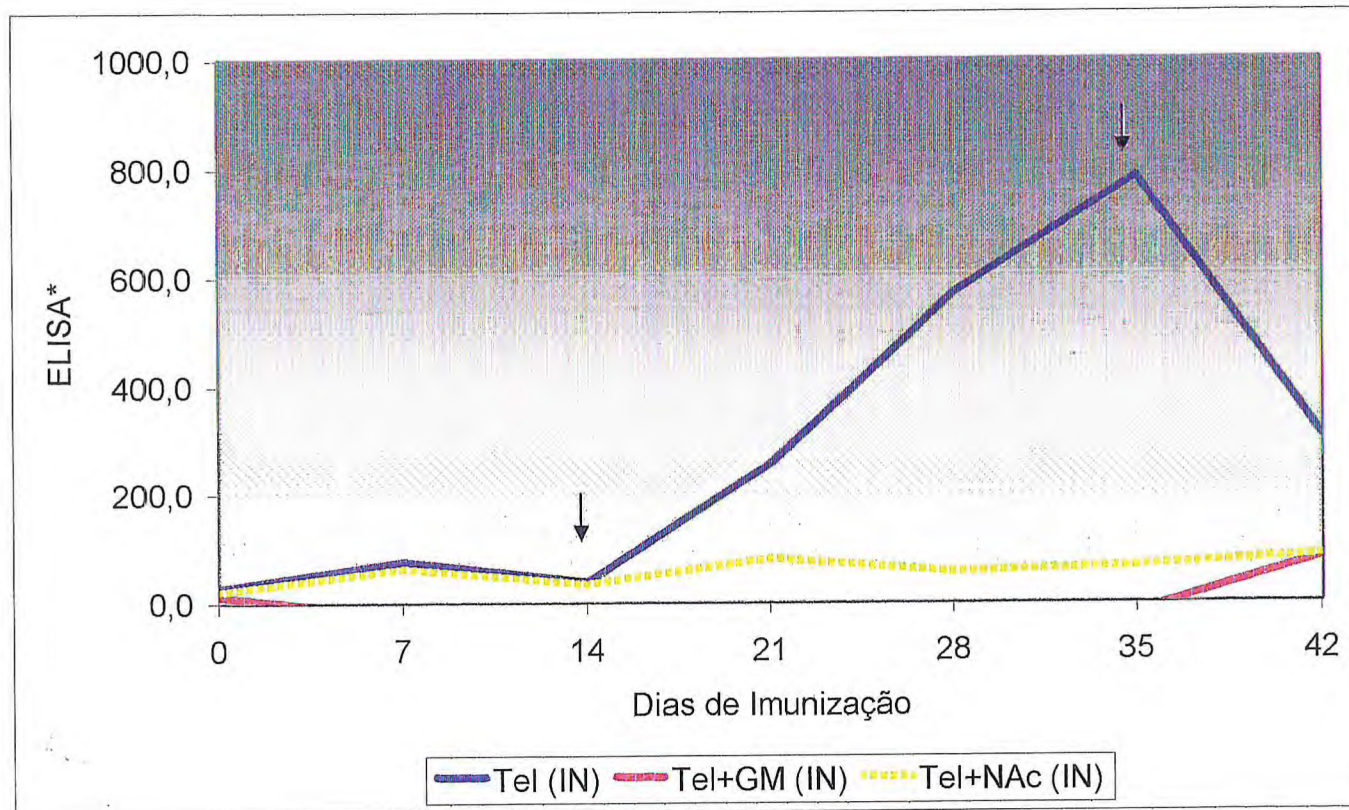


FIGURA 8- Síntese de anticorpos específicos (IgM, IgG, igA) induzida pela lectina de *Talisia esculenta* associadas aos seus açúcares ligantes, em camundongos imunizados com 10 $\mu$ g pela via subcutânea. Títulos determinados através de escores de ELISA\*.

Na tabela 8 e na figura 16 pode observar-se que o peso da massa total de ovos (PMTO), foi de  $129,09 \pm 44,28$  mg nas fêmeas do tratamento com PBS 0,1M, pH 7,4, valor significativamente superior àquele encontrado para as fêmeas tratadas com a TEL na dose de  $400\mu\text{g/mL}$ , que produziram apenas  $80,40 \pm 3938$  mg de ovos. Essa dose de  $400\mu\text{g/mL}$ , foi escolhida por representar um ponto intermediário entre as diversas doses testadas na análise de regressão, anteriormente apresentada.

A figura 15 mostra a análise de regressão da massa total de ovos posto pelas fêmeas do carrapato *R. sanguineus* em função da concentração de TEL. Na faixa de concentração de TEL, que variou de 100 a  $4000\mu\text{g/mL}$ , a massa total de ovos não foi afetada. A equação obtida a partir da linha de tendência  $y = -10,127x^2 + 43,366x + 7.2907$ , significou que, o aumento na variável "x" (logaritmo da dose), não produziu no valor assumido pela variável "y" (massa total de ovos postos). Como esses dados se distribuíram irregularmente na área do gráfico, a melhor equação obtida apresentou  $R^2$  de apenas 0,5588, e essa espécie teve seus dados desprezados nos cálculos futuros.

Os pesos das quenógenas de *B. microplus* também foram influenciados pela ação da lectina pura (figura 17 e tabela 8). As teleóginas desse grupo apresentaram uma menor perda de peso ( $172,49 \pm 40,94$  mg), enquanto que as do grupo tratado com PBS 0,1M, pH 7,4, apresentaram um valor significativamente superior ( $206,05 \pm 41,53$  mg).

Na tabela 8 e figuras 18 e 19 pode ser observado que os índices de eficiência reprodutiva (IER) e nutricional (IEN), utilizados como indicativos, respectivamente, para predizer o poder de proliferação e a condição do metabolismo nutricional desses parasitas, foram significativamente afetados pelo tratamento com a lectina pura (IER  $34,88 \pm 1844$  mg e IEN  $44,84 \pm 17,88$  mg) quando comparados ao grupo PBS 0,1M, pH 7,4 (IER  $49,89 \pm 12,40$  e IEN  $61,36 \pm 10,32$ ) ( $p < 0,05$ ).

A investigação foi direcionada para avaliar se os efeitos da TEL, sobre os parâmetros biológicos do carrapato *B. microplus* apresentavam alguma relação com o sítio carboidrato ligante da lectina. Sobre a postura da teléoginas observou-

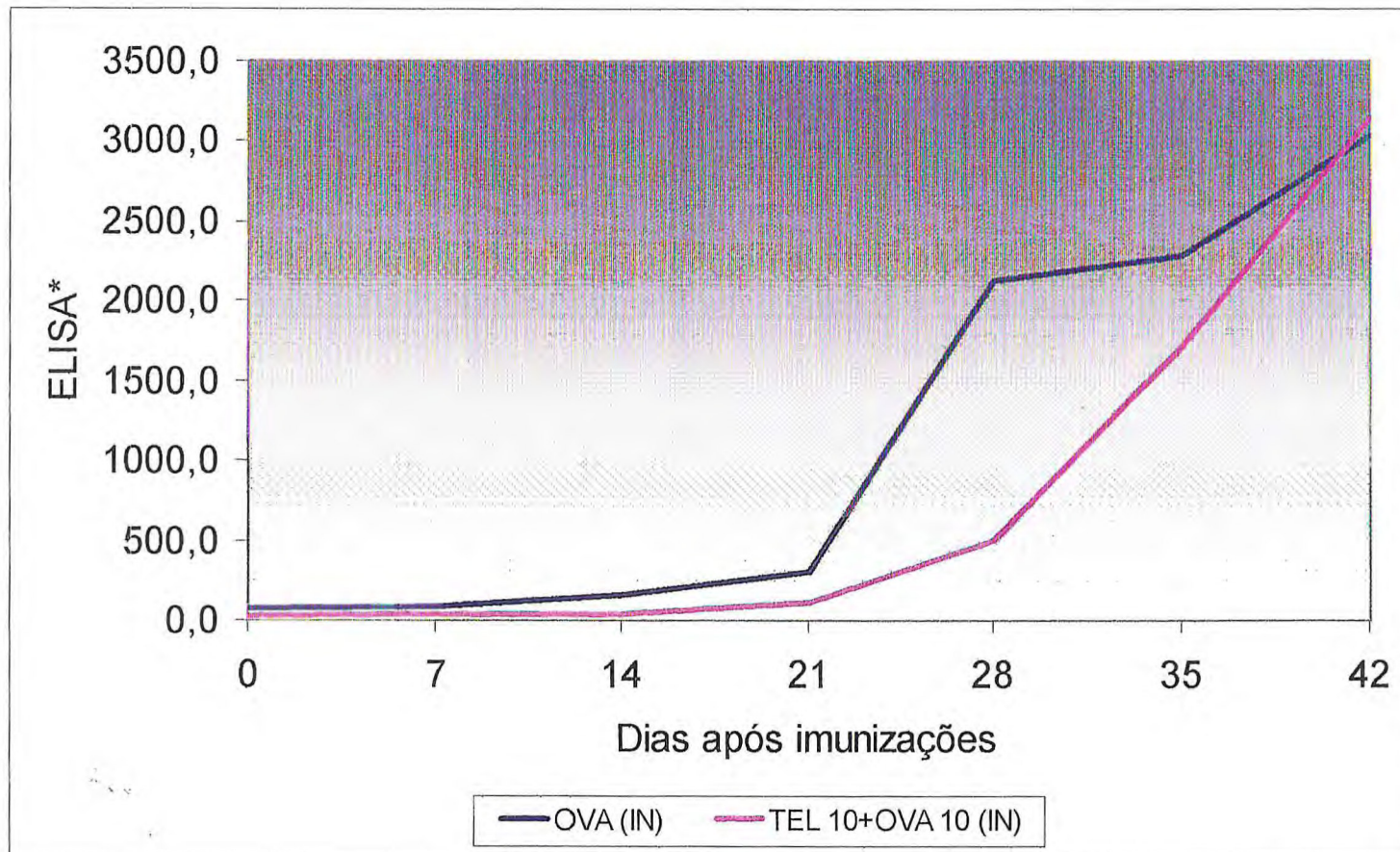


FIGURA 9- Efeito imunoadjuvante da lectina de *Talisia esculenta* sobre a síntese de anticorpos específicos em camundongos imunizados com OVA(10 $\mu$ g), OVA(10 $\mu$ g)+ TEL(10 $\mu$ g) pela via nasal. Títulos determinados através de escores de ELISA\*.



se que os grupos tratados com os açúcares manose-glucose ( $111,91 \pm 23,19$  mg) e N-acetil-D-glucosamina ( $105,26 \pm 28,53$  mg), apresentaram um comportamento similar ao do grupo tratado apenas com PBS 0,1M, pH 7,4 ( $206,05 \pm 41,53$  mg). No entanto sobre o peso das quenógenas somente o açúcar N-acetil-D-glucosamina ( $177,19 \pm 31,92$  mg), demonstrou poder de inibição. Os índices de eficiência reprodutiva e nutricional dos grupos com açúcares ligantes da lectina apresentaram um comportamento similar ao grupo tratado apenas com PBS 0,1M, pH 7,4 o qual resultou no IER  $49,89 \pm 12,40$  e no IEN  $61,36 \pm 10,32$ , tabela 8.

Captação da lectina de *T. esculenta* conjugada na cutícula dos carrapatos *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* através de fluorescência.

Na tentativa de elucidar, pelos menos em parte, as discrepâncias relativas ao efeito da TEL sobre os parâmetros biológicos das duas espécies de carrapatos, este trabalho utilizou a técnica de fluorescência, para detectar a presença da lectina de *T. esculenta* nos ixodídeos estudados. Dois exemplares foram preparados como controles, um deles, cortado sagitalmente, foi corado pelo método da hematoxilina-eosina, o que permitiu a evidenciação das estruturas de interesse: cutícula, ovário e células intestinais (Figura 20 A). O outro corte foi incubado com salina, ao microscópio pode ser evidenciado que o mesmo emite uma refringência (Figura 20 B).

A cutícula da espécie *Boophilus microplus* apresentou fluorescência (figura 21 A e B), o que não foi observado nem nos ovários, nem nas células intestinais. Não foi evidenciada fluorescência na cutícula das fêmeas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, quando as mesmas foram tratadas com a lectina de *Talisia esculenta* associada a FITC.

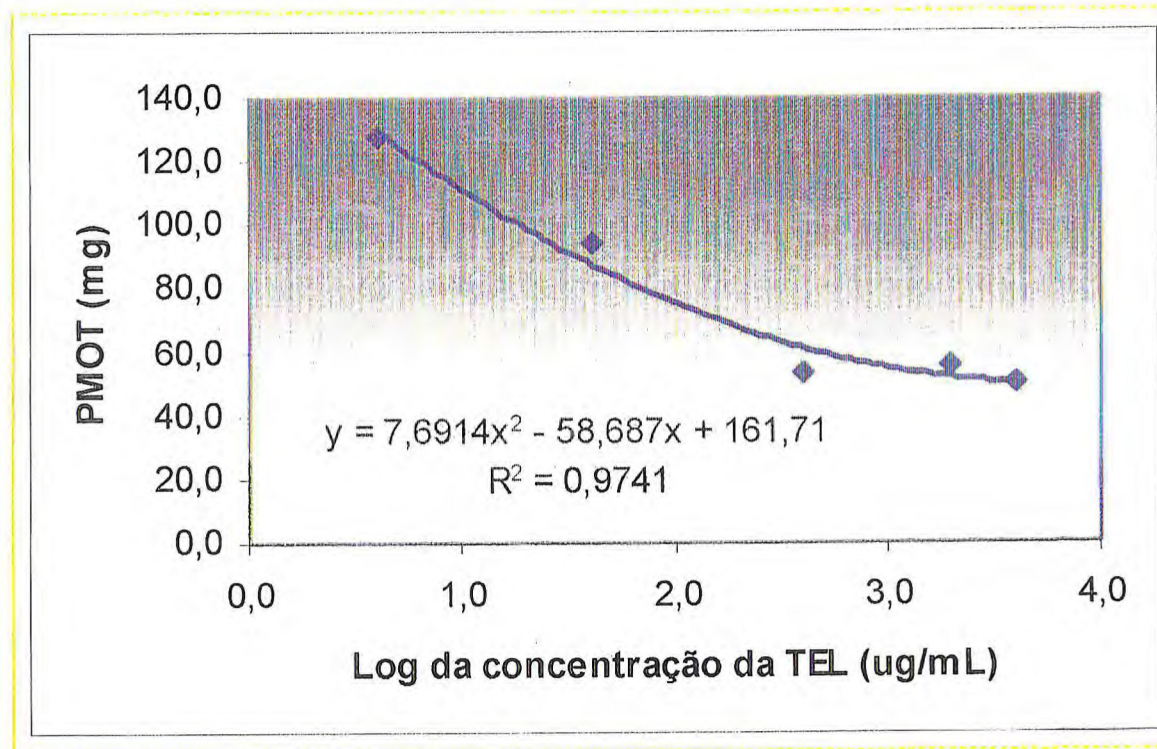


Figura 10. Curva de regressão da massa total de ovos postos por fêmeas do carrapatos *Boophilus microplus* em função da concentração de TEL.

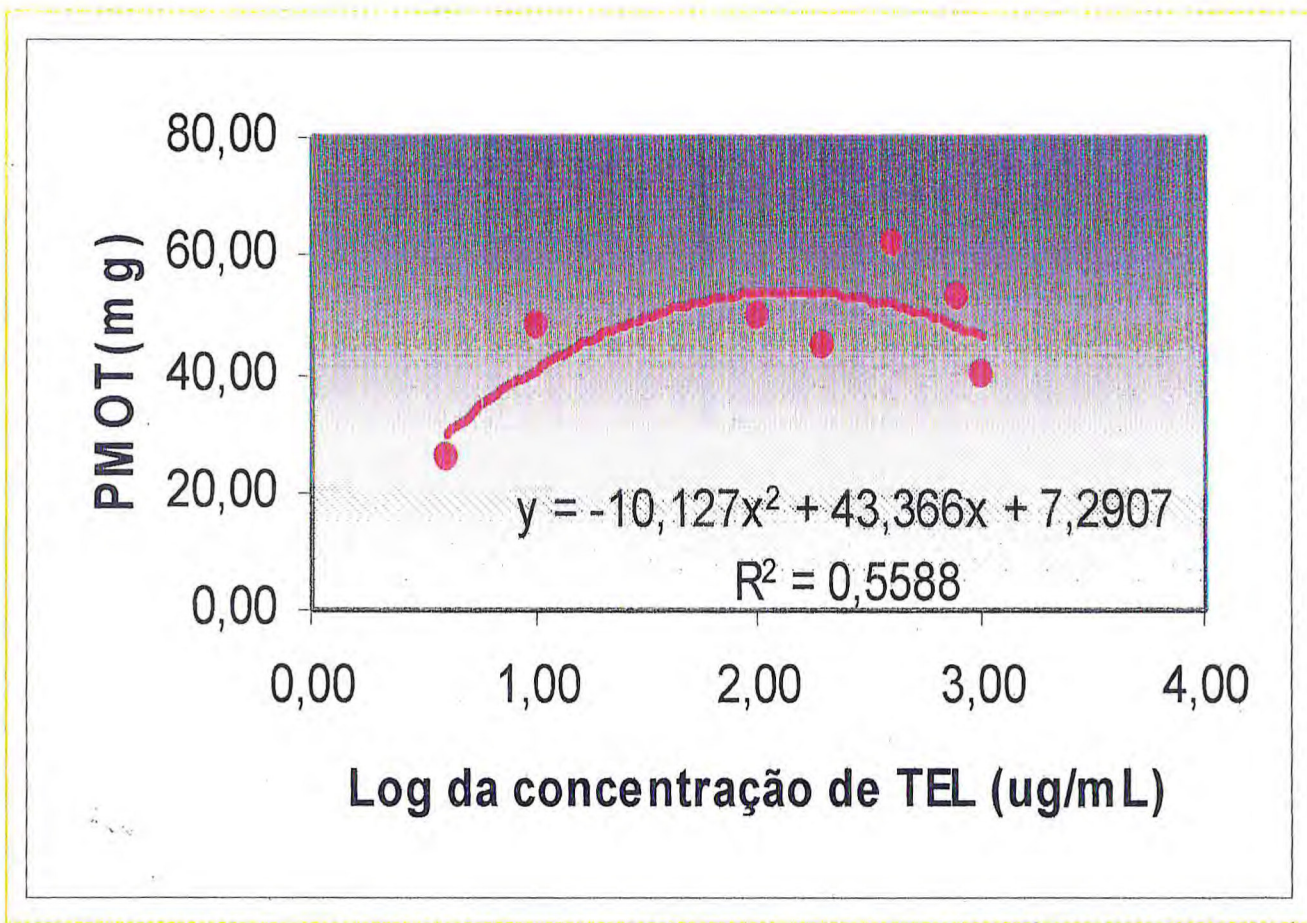


Figura 11. Curva de regressão da massa total de ovos posta por fêmeas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* em função da concentração de TEL.

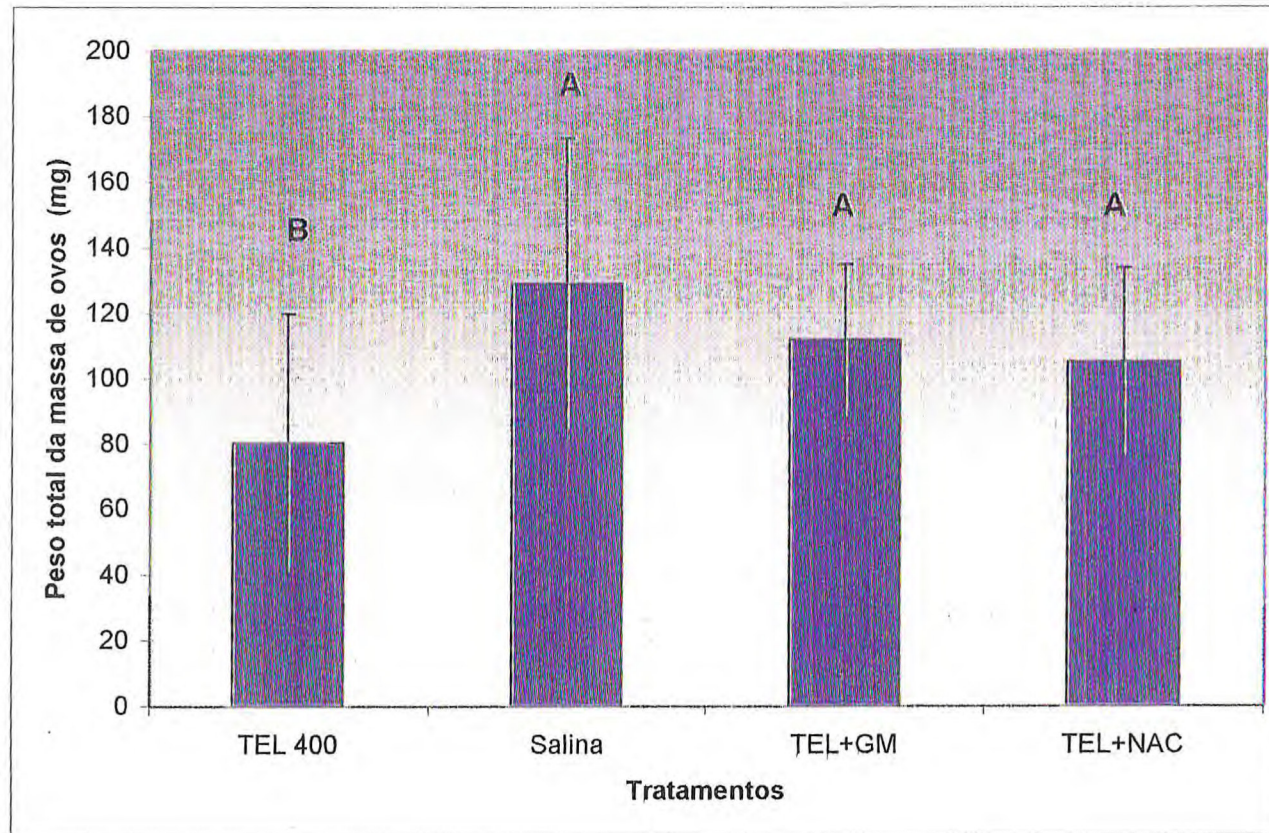


FIGURA 12. Efeito da lectina de *Talisia esculenta* (TEL), pura e pré-tratada com carboidratos específicos, sobre a massa total de ovos postos (PMOT) por fêmeas do carrapato de bovinos *Boophilus microplus*. Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

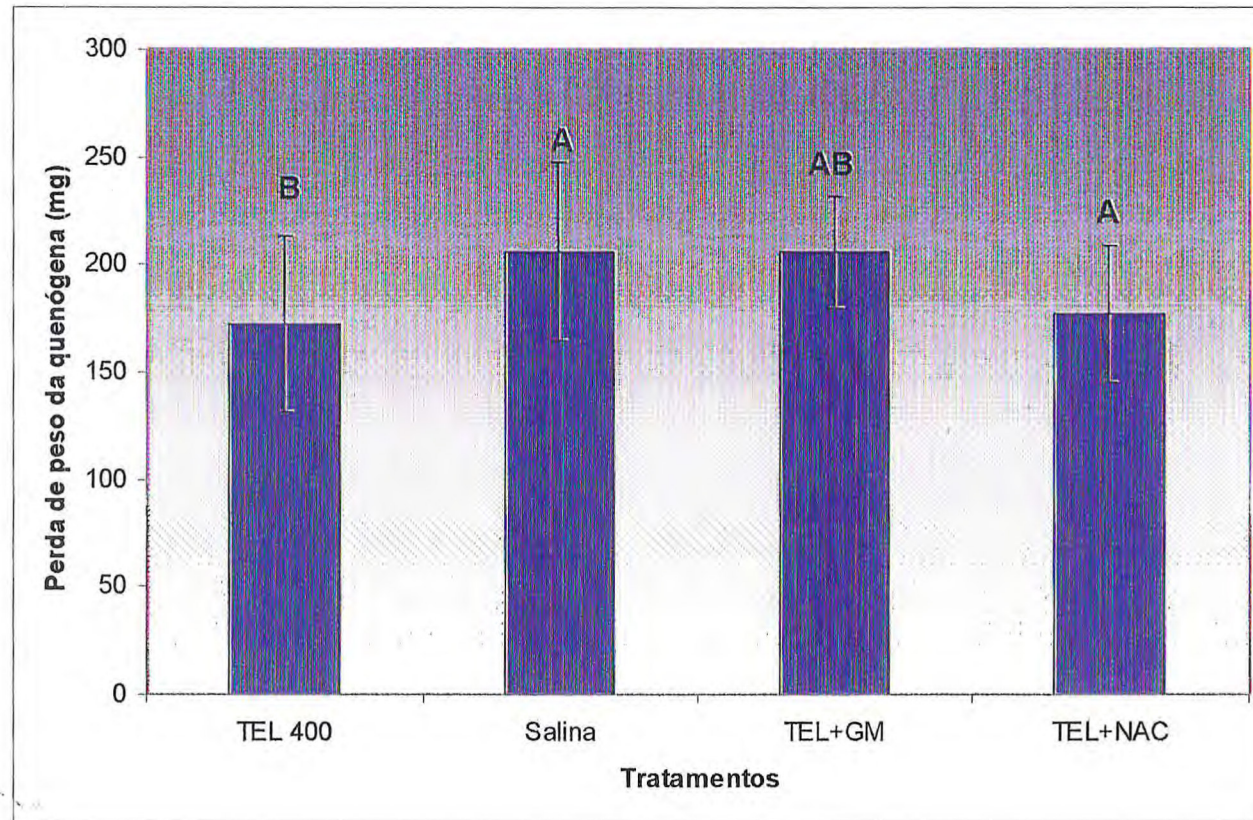


FIGURA 13. Efeito da lectina de *Talisia esculenta* (TEL), pura e pré-tratada com carboidratos específicos, sobre a perda de peso da quenógena do carrapato de bovinos *Boophilus microplus*.

Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

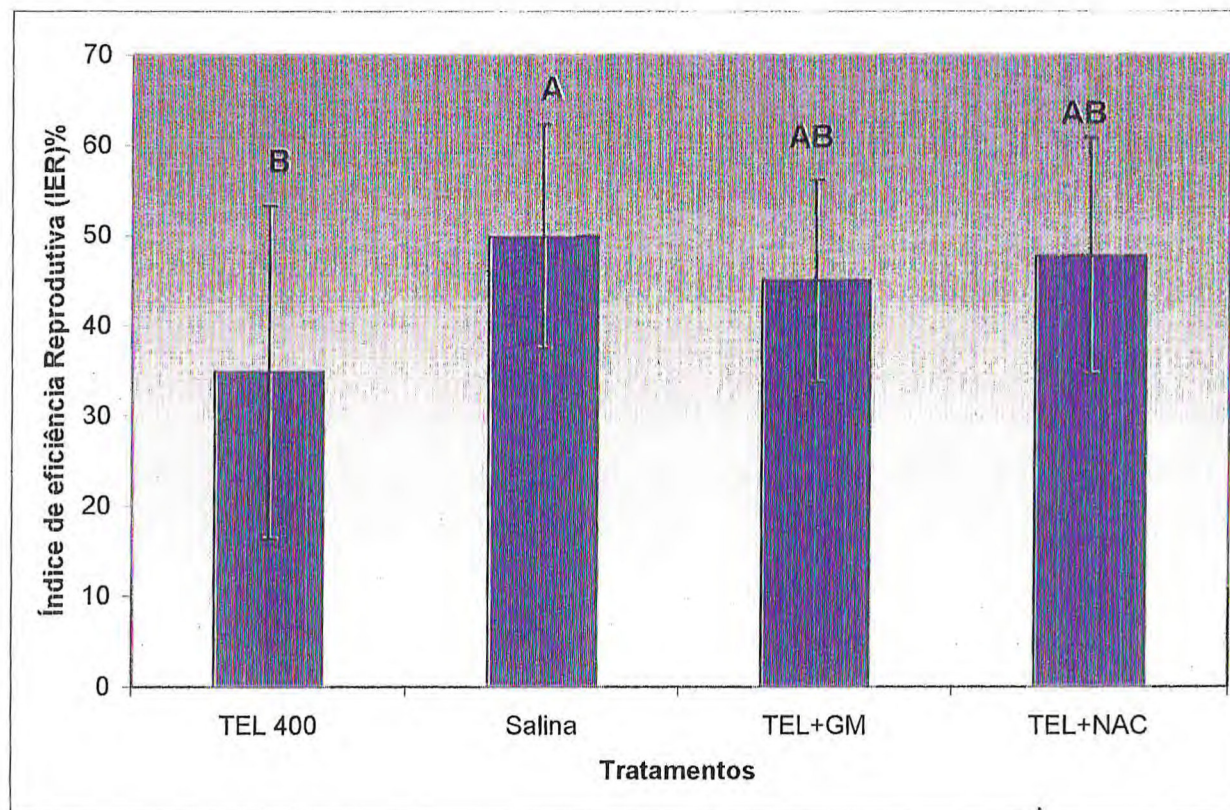


FIGURA 14. Efeito da lectina de *Talisia esculenta* (TEL), pura e pré-tratada com carboidratos específicos, sobre o Índice de Eficiência Reprodutiva (IER) de fêmeas do carrapato de bovinos *Boophilus microplus*.

Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

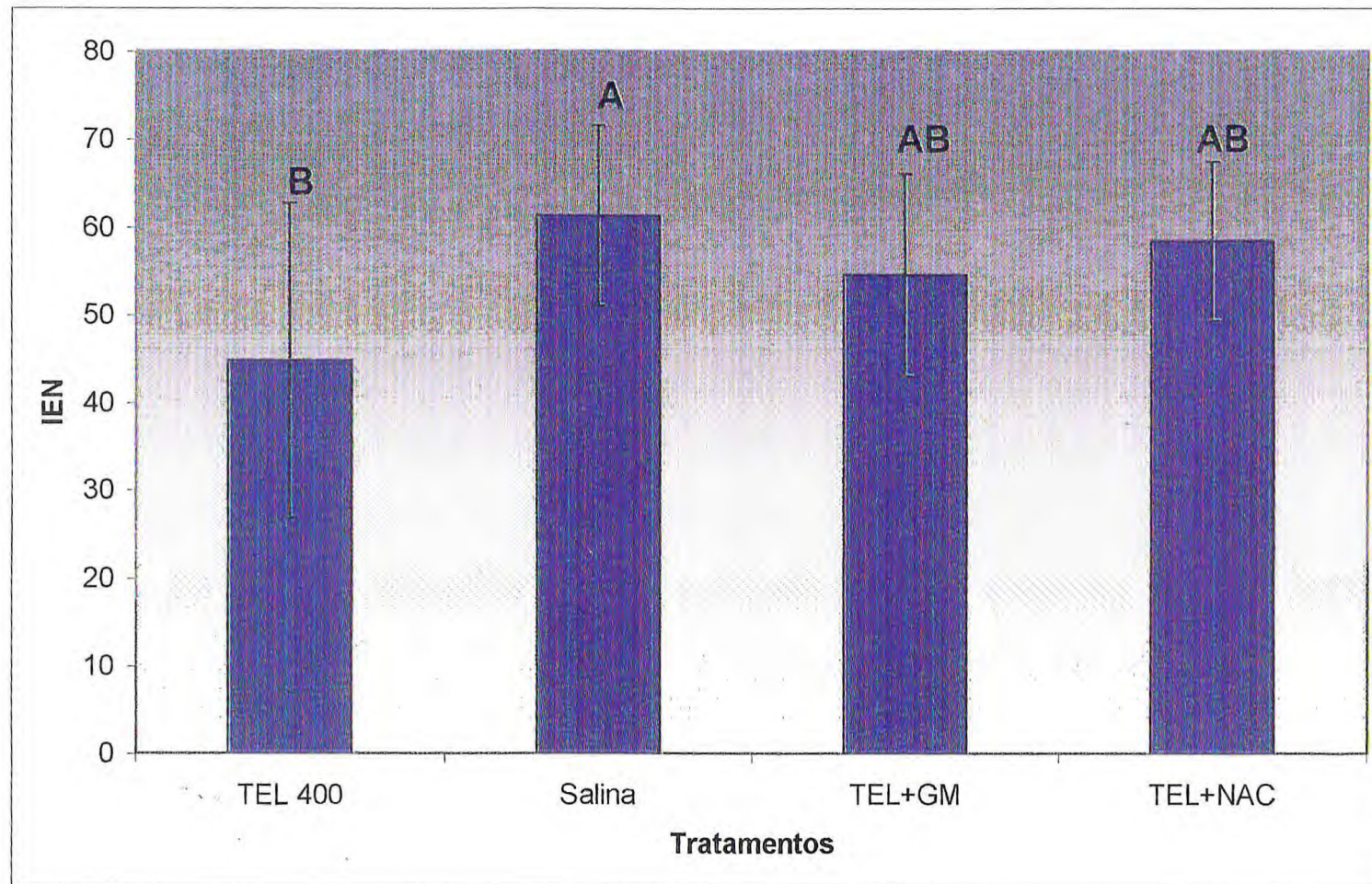


FIGURA 15. Efeito da lectina de *Talisia esculenta* (TEL), pura e pré-tratada com carboidratos específicos, sobre o Índice de Eficiência Nutricional (IEN) de fêmeas do carrapato de bovinos *Boophilus microplus*.

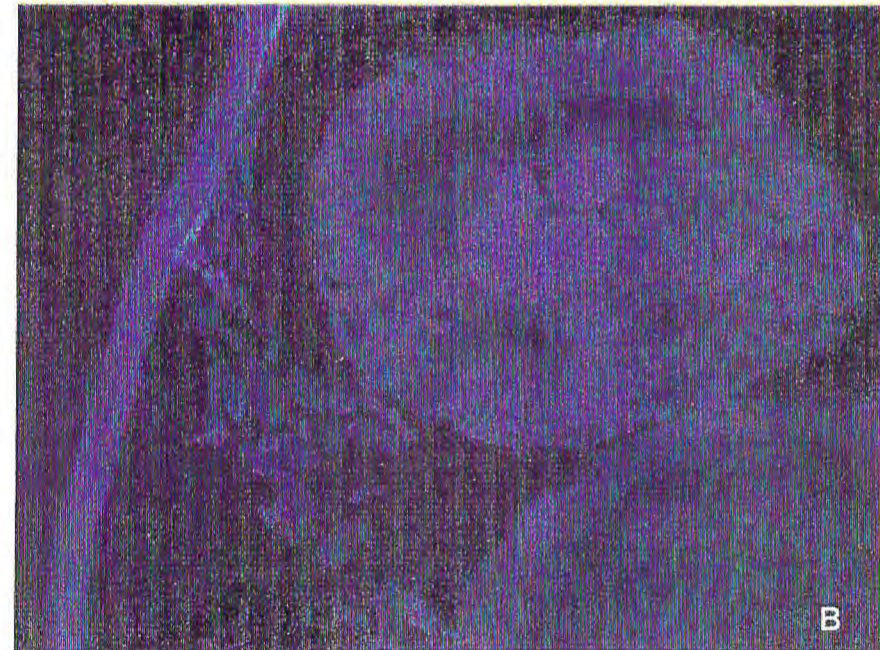
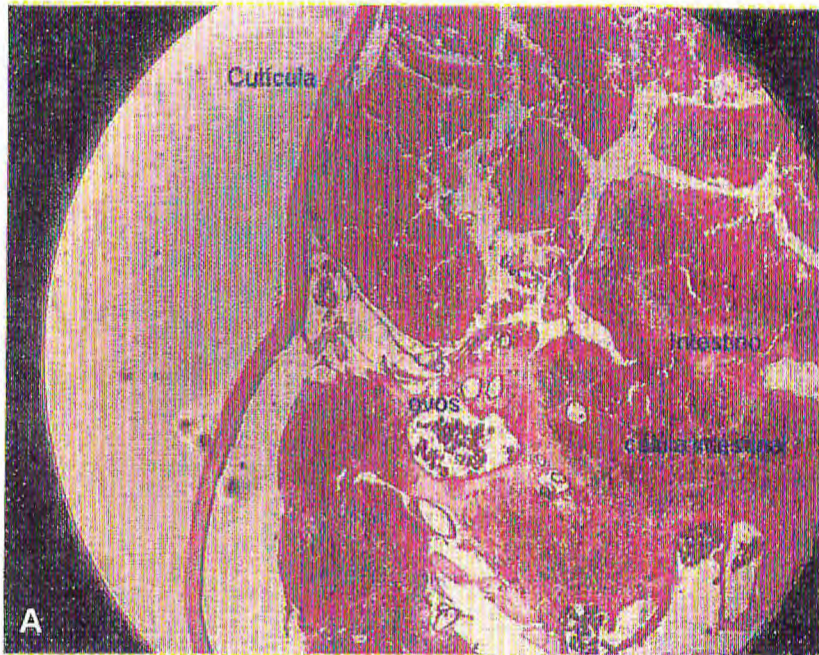


Figura 16 Corte transversal do carrapato *Boophilus microplus*: A – Foto evidenciando a cutícula, ovário e células intestinais (corados pela hematoxilina-eosina) Aumento X40; B- Foto evidenciando a cutícula e ovário (material incubado com salina) aumento X100.



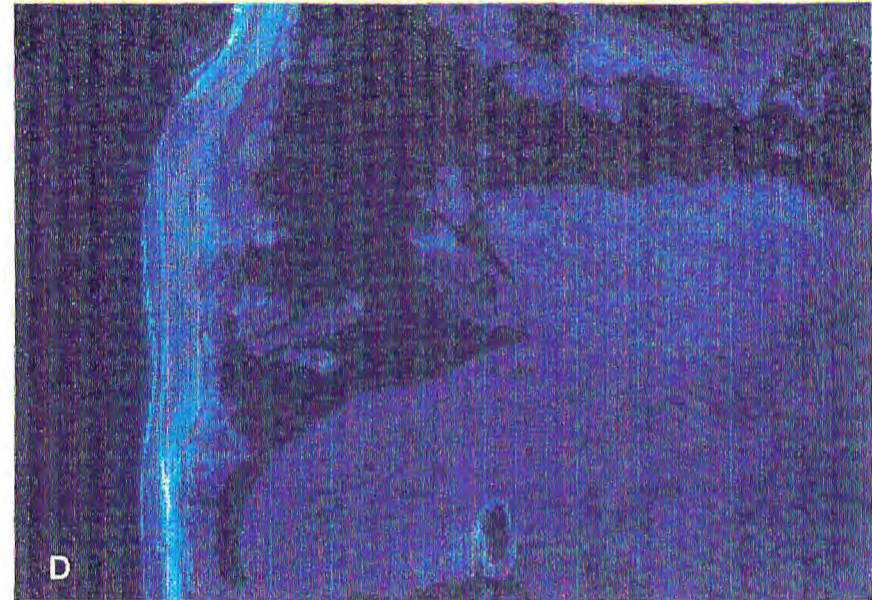
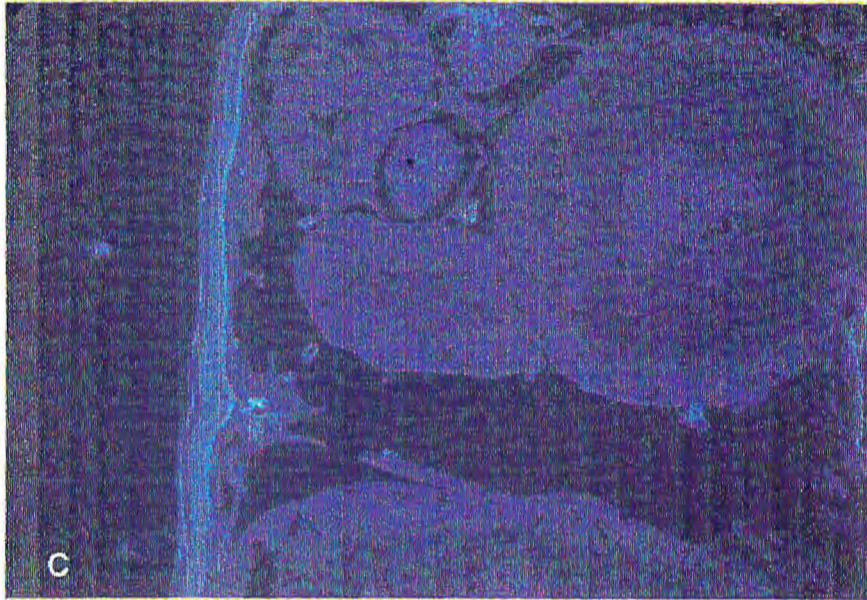


Figura 17 Corte transversal do carrapato *Boophilus microplus*: C – Foto evidenciando a cutícula e ovário (incubado com a lectina de *Talisia esculenta* conjugada a FITC), aumento X100; D- Imagem vista em C aumentada X400.

## 7. DISCUSSÃO

A análise elementar da farinha foi feita no intuito de caracterizar quimicamente as amostras de sementes da espécie vegetal da qual foi obtida a lectina TEL, empregada na presente investigação.

A imunogenicidade das lectinas tem despertado o interesse de pesquisadores no mundo inteiro, pelas suas potencialidades como ferramentas em vários estudos biológicos.

Em especial, algumas das lectinas mitogênicas utilizam as propriedades da interação proteína-carboidrato e a ligação cruzada para glicanos para estimular a resposta imunológica. Isso, na dependência da afinidade da lectina aos receptores ou co-receptores glicanos presentes nas membranas dos diversos tipos celulares (TRIPATHI & MAITTI, 2005).

Em recentes estudos experimentais a lectina de *T. esculenta* demonstrou induzir intensa reação inflamatória em diferentes cavidades, estimular a produção de ON dose-dependente por macrófagos e produzir efeito edematogênico intraplantar (FREIRE *et al.*, 2001 e 2003). Partindo dessa premissa, a primeira parte deste trabalho explorou o efeito da TEL sobre a imunogenicidade e o efeito adjuvante sobre a ovalbumina, em camundongos imunizados nas vias subcutânea e nasal.

Resposta imunológica avaliada pela síntese de anticorpos específicos induzida pela lectina de *T. esculenta*.

Efeito da administração subcutânea da lectina de *Talisia esculenta* sobre os níveis séricos de imunoglobulinas.

A lectina de *Talisia esculenta* (TEL) mostrou potencial imunogênico, tanto na dose alta (100 µg) quanto na dose baixa (50 µg) (Figura 8, Tabela 2). Através do teste

de ELISA pode-se observar elevados níveis de imunoglobulinas específicas, já na resposta primária e os títulos mais elevados ocorreram na imunização com a dose alta (100 µg), sugerindo ser uma imunogenicidade dose dependente (Figura 9). Diferentemente, as respostas imunes induzidas pelas lectinas de *Artocarpus heterophilus*, jacalina e artocarpina foram dose independente DANTAS *et al.*, 2000. NUNES, 1985; ALBUQUERQUE, 1994 e YOON *et al.*, 2001 encontraram respostas superiores, quando investigaram a imunogenicidade das lectinas de *Dioclea grandiflora* e jacalina e de KML-C oriunda de *Viscum album coloratum*.

Na dose alta (100µg) a TEL induziu a produção de imunoglobulinas (G,M,A) em níveis superiores aos induzidos pela OVA administrada na mesma dose (100µg), aos animais do grupo controle (Figura 8). Semelhança, também encontrada por LAVIGNE *et al.*, 2002.

A resposta imunológica primária foi mais intensa com a dose de 50µg de TEL (Figura 9), embora tenha declinado já na 2ª semana, permanecendo os níveis de anticorpos inferiores aos dos animais tratados com a dose alta (100µg) e superiores aos do grupo OVA. Em comparação com a TEL, YOON *et al.*, 2001, também encontraram uma resposta primária elevada para a lectina de *V. album* (KML-C), no entanto os níveis de anticorpos permaneceram elevados no decorrer de todo o experimento. Diferentemente da TEL, a jacalina e a artocarpina produziram insignificantes respostas primárias DANTAS *et al.*, 2000.

A resposta secundária mostrou-se elevada para todos os tratamentos, exceto para o grupo controle PBS. Os tratamentos dos animais, com a dose baixa e com a OVA apresentaram similaridades na produção de imunoglobulinas totais, muito embora, a produção de anticorpos anti-TEL tenha mostrado maior estabilidade. A dose alta produziu níveis de anticorpos superiores aos demais tratamentos, atingindo valor máximo na 3ª semana, declinando na 7ª (Figura 8). Esse mesmo comportamento foi observado por DANTAS *et al.*, 2000 em relação dose de alta da jacalina, lectina de *Artocarpus heterophilus*.

Os tratamentos com dose baixa de TEL e com a OVA alcançaram níveis elevados de anticorpos, na 4ª semana. Anticorpos anti-jacalina e anti-artocarpina foram detectados somente após o primeiro reforço, na 4ª semana e se mantiveram

até a 6° (DANTAS *et al.*, 2000) e ao contrário da TEL, a imunogenicidade dessas duas lectinas não apresentou dependência em relação à dose. Ainda na (Figura 8), verifica-se que os anticorpos anti-OVA na 4° semana declinaram até a 6° semana. O perfil de anticorpos produzidos contra essa proteína neste ensaio confirma a tendência observada por (BREWER *et al.*, 1998; LAVIGNE *et al.*, 2002). A ovoalbumina é uma glicoproteína, imunogênica, utilizada em testes padrões de imunogenicidade e alergenicidade (HAUTINGTON & STEIN, 2001) e a mesma induz resposta do tipo T<sub>H</sub>2, associada à produção de anticorpos IgE pelos linfócitos B timo dependentes (BREWER *et al.*, 1998).

Concluído o período experimental, foi observado que a TEL isoladamente é imunogênica e a dose alta (100µg) superou os outros tratamentos, sobretudo o grupo dos animais imunizados somente com ovalbumina (Figura 8). Essa diferença sugere que as respostas elicitadas por ambas as proteínas pode ser resultado da ligação a diferentes receptores celulares.

Sabe-se que as lectinas podem ligar-se a receptores glicanos presentes nos leucócitos (KRUGLUGER *et al.*, 1996; HERRE *et al.*, 2004), diferenciá-los e ativá-los e essa ligação é um passo central para iniciar uma via de sinalização (GABIUS, 2001). Uma vez ligados oligossacarídeos podem influenciar as propriedades físico-químicas e biológicas dessas proteínas por afetarem seu dobramento e modificarem suas interações com outras biomoléculas.

As lectinas indutoras de respostas imunológicas estudadas até o momento, não possuem um padrão definido de atividade imunogênica. As lectinas PHA, ConA, *Canavalia brasiliensis* e *Dioclea virgata* parecem induzir respostas de defesa mediadas essencialmente por células T. *Dioclea rostrata* e *Cratylia floribunda*, lectinas da subtribo *Diocleinae*, ativam a produção de IFN- $\gamma$  e lectina *pokeweed* (PWM) é seletiva para linfócitos B (BARRAL-NETO *et al.*, 1992). A ligação da lectina *Peanut agglutinin* (PNA) em células imunocompetentes, pode se correlacionar à diferenciação e ativação de linfócitos T e a capacidade de apresentação de antígenos por macrófagos e células B (SHERBINI *et al.*, 2000).

Efeito dos carboidratos sobre a imunogenicidade da lectina de *Talisia esculenta* administrada a camundongos pela via subcutânea.

Um dos objetivos desta investigação era verificar se, caso a lectina de *Talisia esculenta* fosse imunogênica, se esta propriedade era dependente de sua atividade como lectina, isto é, se os determinantes antigênicos da molécula estavam ou não localizados próximos ou no próprio sítio de atividade carboidrato-ligante, ou se apenas seria a ação de uma proteína agindo como antígeno.

Para verificar se a imunogenicidade da lectina de *Talisia esculenta*, quando aplicada em camundongos por via subcutânea, era dependente da atividade lectínica da TEL ou não foram montadas a Figura 9 e a Tabela 3. A TEL apresentou afinidade específica prioritariamente direcionada para resíduos de manose-glucose e em menor grau, para N-Acetil-D-glucosamina. FREIRE *et al.*, 2001 isolaram quatro isoformas da TEL, as quais demonstraram ser inibidas preferencialmente pelo carboidrato manose, seguido de glucose e N-Acetil-D-glucosamina.

Visualiza-se na Figura 9, que presença desses açúcares interferiu sensivelmente sobre a atividade imunogênica da TEL. Tal interferência pode ser observada desde à primeira semana após a imunização e se torna mais evidente no decorrer do experimento. Denotando que os epítomos estão provavelmente localizados nas imediações do sítio lectínico. Os mesmos resultados da ação de açúcares específicos sobre a imunogenicidade de lectinas foram demonstrados por (YOON *et al.*, 2001).

Foi notada uma diferença significativa em relação aos efeitos da TEL através dos dois açúcares inibidores nas quatro primeiras semanas. Aparentemente o carboidrato N-Acetil-D-glucosamina produziu maior interferência no desenvolvimento da resposta humoral contra a TEL até a 4ª semana. O resultado final na 6ª semana demonstra efeitos similares para os dois açúcares testados sugerindo que os epítomos estão provavelmente localizados nas imediações do sítio lectínico, aparentemente a presença de N-Acetil-D-

glucosamina tem maior poder de interferência no desenvolvimento da resposta imunológica contra a TEL até cerca de 28 dias após a aplicação. Mais tarde, ou seja, duas semanas depois, os dois açúcares passam a influenciar de modo equivalente a intensidade da resposta imunológica nesta via.

FREIRE *et al.*, 2002, registraram que o carboidrato manose foi mais potente em inibir o efeito inflamatório da TEL em bolsa de ar subcutânea e na cavidade peritoneal, quando comparado a glucose. É possível que a razão da diferença no comportamento da resposta imunológica anti-TEL associada aos açúcares esteja ligada aos diferentes mecanismos através dos quais foi induzida a produção de anticorpos nessa via de aplicação. Provavelmente, a TEL tenha sido capturada por células apresentadoras de antígenos (APCs) que degradaram a molécula original e apresentaram seus determinantes antigênicos a linfócitos T locais, os quais estimularam células B a produzirem anticorpos anti-TEL. A presença dos açúcares pode ter influenciado o reconhecimento da TEL como substância estranha pelas APC e/ou o reconhecimento dos epítomos pelos linfócitos T. Nesse caso, em particular, a interferência da N-Acetil-D-glucosamina foi maior do que a da manose-glucose.

Efeito imunoadjuvante da lectina de *Talisia esculenta* em camundongos imunizados pela via subcutânea com ovalbumina.

O poder imunogênico da TEL, capaz de desencadear uma intensa reação inflamatória, foi investigado com vistas à sua possível utilização como substância adjuvante.

Na Figura 10, nota-se que a TEL amplificou na resposta imune humoral contra a ovoalbumina, aplicada por via subcutânea, apenas na dose baixa (50 $\mu$ g) e que esse efeito adjuvante foi inferior quando comparado com o grupo de animais que recebeu emulsão de OVA com AL(OH)<sub>3</sub>. Possivelmente, a utilização da TEL em doses mais elevadas tenha afetado a produção de anticorpos contra a OVA, impedindo que aquela proteína exercesse ação adjuvante quando associada a

esta última. Embora seja capaz de provocar uma intensa reação inflamatória, que poderia favorecer o desenvolvimento de uma resposta de defesa, a TEL em dose elevada pode direcionar a produção de anticorpos de tal maneira que, proporcionalmente, haverá muito mais anticorpos anti-TEL do que anticorpos anti-OVA após a aplicação das duas proteínas conjuntamente.

A TEL demonstrou um comportamento parecido com o da artocarpina que modulou anticorpos para a ovalbumina independentemente da dose. Essas lectinas poderiam se ligar ao resíduo de açúcar presente na OVA. No entanto, DANTAS *et al.*, 2000, observaram que o efeito modulador produzido pela jacalina e pela artocarpina sobre a síntese de anticorpos anti-OVA, não estava relacionado à ligação delas com esta proteína, ainda que a OVA contenha resíduo de manose em sua estrutura (HAUTINGTON & STEIN, 2001).

A proteína inativadora de ribossomos (RIP-2) de *Viscum album-1* (YOON *et al.*, 2001; GABIUS *et al.*, 2001) e toxinas bacterianas como o *Vibrio cholerae* (CT) (LAVIGNE *et al.*, 2002), têm sido apontadas como potentes imunógenos, quando utilizadas em imunizações subcutâneas.

Embora não estejam elucidados os passos dos mecanismos de modulação, sabe-se que as lectinas podem induzir a síntese de citocinas (TAIMI *et al.*, 1994; LIMA *et al.*, 1999; YOON, *et al.*, 2001; TRIPATHI & MAITTI, 2005). A indução e a secreção de várias citocinas foi demonstrada em relação as lectinas jacalina (TAIMI *et al.*, 1994), *Pisum sativum* (PSA) (LIMA *et al.*, 1999), *Viscum album* (KML-C) (YOON, *et al.*, 2001) e a aglutinina de *Abrus precatorius* (TRIPATHI & MAITTI, 2005).

Efeitos da lectina de *Talisia esculenta* sobre os níveis séricos de imunoglobulinas pela via nasal.

A mucosa nasal é o primeiro ponto de contato com antígenos inalados (McGHEE *et al.*, 1999 e DAVIS, 2001). Essa mucosa é relativamente permeável a moléculas de alto peso, oferece um ambiente menos hostil que a mucosa do

intestino e as suas secreções diluem menos os antígenos que nela são administrados (JEPSON *et al.*, 2004).

No gráfico da Figura 11 e na Tabela 5, observa-se a síntese de anticorpos específicos induzida pela TEL quando instilada na concentração de 10 $\mu$ g na via intranasal seguida de dois reforços. Neste modelo observou-se, que embora os títulos de anticorpos anti-TEL tenham superado os do grupo instilado com PBS, eles foram inferiores, desde a resposta primária, aos grupos de animais instilados com OVA na mesma dose. Essa diferença sugere que as respostas elicitadas por ambas as proteínas na via nasal podem ser resultado da ligação a diferentes receptores celulares.

Esse resultado, referente à imunogenicidade da TEL pela rota nasal, difere dos dados de LAVELLE *et al.*, 2000, que encontraram para as lectinas ML-1 (*Viscum album-1*) e LEA (*Lycopersicum esculentum*) altos títulos de anticorpos em comparação com a OVA. Esses mesmos autores encontraram respostas anti-WGA, anti-UEA-1 e anti-PHA, inferiores às encontradas neste trabalho. Eles ainda notificaram que a WGA, que compartilha da mesma especificidade por carboidratos com a LEA, induziu resposta humoral menos significativa que a mesma.

Tem sido demonstrado que algumas lectinas podem induzir a secreção de diferentes citocinas *in vitro* (TAIMI *et al.*, 1994; RIBÉREAU-GAYON *et al.*, 1996; LIMA *et al.*, 1999; GABIUS, 2001; YOON, *et al.*, 2001; TRIPATHI & MAITI, 2005) isso pode estabelecer as diferenças nos efeitos biológicos gerados por essas proteínas.

Os resultados deste trabalho apontam uma tendência ascendente para a resposta anti-OVA, da 3<sup>o</sup> semana até a 6<sup>o</sup> semana no terço final do período experimental. Esses dados também diferem de LAVELLE *et al.*, 2000, que detectaram baixos títulos de anticorpos específicos para OVA, no soro de camundongos após as três imunizações intranasais, com esse antígeno.

A resposta imune humoral anti-TEL apresentou uma discreta elevação, comparada à induzida pela OVA, depois do primeiro reforço, seguida de tendência



à estabilidade na 6<sup>o</sup> semana, isso foi verificado mesmo depois da administração do segundo reforço na 5<sup>o</sup> semana.

A instilação de um antígeno particulado ou solúvel na mucosa nasal pressupõe que o mesmo se ligue à célula M (JEPSON *et al.*, 1996; GEBERT, 1997; ERMAK & GIANNASCA, 1998; KRAEHENBUHL & NEUTRA, 2000) através de receptores (JEPSON & CLARRK, 2001; CLARRK & JEPSON, 2003) seguida da internalização do empacotamento e do encaminhamento desse antígeno aos linfócitos da lâmina própria. Nos murinos, as células M desempenham papel importante na apresentação de antígenos particulados ou solúveis nas mucosas (JEPSON *et al.*, 1996; GEBERT, 1997; ERMAK & GIANNASCA, 1998; KRAEHENBUHL & NEUTRA, 2000), com os quais interagem através de receptores ricos em glicoconjugados, que podem influenciar na apreensão desses antígenos inalados e, conseqüentemente, na resposta imunológica dirigida a eles. (GIANNASCA *et al.* 1997; JEPSON & CLARRK, 2001; ANDOH *et al.*, 2002; CLARRK & JEPSON, 2003).

A seletividade de algumas lectinas por células M tem sido bem documentada (CLARK *et al.*, 1995; JEPSON *et al.*, 1996; SHARMA *et al.*, 1996; GIANNASCA *et al.*, 1997; MANTIS *et al.*, 2000). Provavelmente a presença de glicoconjugados nessa mucosa pode permitir a ligação dessas proteínas em estruturas alvo da resposta imune.

Estudos histoquímicos de lectinas (GEBERT, 1995; GIANNASCA *et al.*, 1997; JEONG *et al.*, 1999) demonstraram que algumas delas, com especificidade variada podem ligar-se às células M trato respiratório de animais de laboratório.

O compartimento nasal possui intensa atividade muco-ciliar, que remove com rapidez moléculas que estejam depositadas na superfície das células. Contudo, apesar de ser uma mucosa menos hostil, comparada à mucosa intestinal; os antígenos nela podem ser degradados. Além do que a absorção de substâncias neste sítio pode grandemente ser afetada pelo tamanho, carga, hidrofobicidade da molécula a ser administrada, e pela acessibilidade dela ao seu receptor na mucosa (MANTIS *et al.*, 2000). Por fim, convém considerar que a instilação de antígenos através das narinas em parte pode ser deglutida EYLES *et*

*al.*, 1999; McGHEE *et al.*, 1999 e atingindo a mucosa oral, trazendo conseqüências a imunogenicidade da molécula.

Efeito dos carboidratos sobre a imunogenicidade da lectina de *Talisia esculenta* instilada na via intranasal

Apesar de ter sido demonstrado anteriormente que a TEL não é tão potente quanto a OVA na indução de resposta imune após aplicação por via intranasal (Tabela 6, Figura 12), deve-se ressaltar que ela provocou uma resposta, que mostrou ser significativamente superior ao controle negativo PBS ( $p < 0,05$ ).

A interferência dos açúcares manose-glucose e N-acetil-D-glucosamina, sobre a imunogenicidade da lectina de *Talisia esculenta* instilada na via intranasal encontram-se na (Figura 12, Tabela 6).

A administração da TEL associada com açúcares inibidores afetou sua imunogenicidade. Nota-se que na primeira semana de ensaio, a associação da TEL à manose-glucose causou uma redução na resposta anti-TEL. Em relação ao açúcar N-Acetil-D-glucosamina, o efeito sobre a resposta imune anti-TEL, só foi evidenciado na terceira semana. No entanto, no decorrer do experimento, esses carboidratos afetaram igualmente a produção de anticorpos totais contra a TEL. Em cromatografia de fase reversa essa lectina apresentou quatro isoformas, cujos monossacarídeos manose, glucose e N-acetil-D-glucosamina apresentaram os mais potentes efeitos inibitórios, nos ensaios de inibição da hemaglutinação. No entanto FREIRE *et al.*, 2002 observaram que resíduos de manose foram mais potentes inibidores do efeito da TEL, que glucose e N-acetil-D-glucosamina.

Nesse trabalho durante a maior parte do tempo, isto é, do 7<sup>o</sup> ao 35<sup>o</sup> dia, o efeito da glucose-manose foi significativamente mais forte do que o da N-Acetil-D-glucosamina. É possível que a presença dos açúcares manose-glucose tenha tido maior efeito inicial do que a N-Acetil-D-glucosamina na ligação da TEL às células M e/ou no reconhecimento dos determinantes antigênicos pelos linfócitos após a apresentação da proteína a estas células.

Certamente os receptores de superfície celular que estão envolvidos com a resposta imunológica da via subcutânea e da via intranasal podem ser diferentes, permitindo que os carboidratos manose-glucose tenham maior impacto sobre a resposta imune na via intranasal.

Efeito imunoadjuvante da lectina de *Talisia esculenta* em camundongos imunizados pela via nasal com ovalbumina.

Partindo do princípio de que a aplicação de TEL por via intranasal resultou em uma demonstração do seu poder imunogênico (Figura 11 e na Tabela 5) e que a adição de açúcares anulou este efeito (Figura 12, Tabela 6), testou-se a atividade adjuvante da TEL sobre a síntese de anticorpos anti-OVA após a sua aplicação na mucosa nasal.

Os resultados, demonstrados na Tabela 7 e Figura 13, sugerem que a TEL não tem atividade como adjuvante nesse caso. Os títulos de imunoglobulinas totais foram inferior aos da OVA pura, embora tenha sido notada uma semelhança nas duas últimas semanas de experimento. A TEL não teve, portanto, efeito estimulante sobre a indução da resposta humoral contra a ovoalbumina quando foi instilada associada à OVA. Contrariamente a este trabalho, LAVELLE *et al.*, 2001 encontraram forte poder adjuvante para a OVA co-administrada com a lectina tóxica ML-1 e também com a toxina do cólera (CT). Resultados contrastantes com os de LAVELLE *et al.*, 2001 foram encontrados por ANDOH *et al.*, 2002, mesmo tendo utilizado o mesmo número de imunizações e maiores concentrações de OVA associada ao CT, não obtiveram títulos elevados.

As lectinas UEA-1 e PHA não demonstraram um aumento significativo de anticorpos específicos para OVA segundo LAVELLE *et al.*, 2001 e analogamente à TEL, a lectina de WGA, que não é mitogênica, mas induz a secreção de IL-12 e IFN- $\gamma$  (GABIUS, 1999), não apresentou efeito adjuvante. Inversamente, a lectina LEA de mesma especificidade que a WGA, mostrou forte adjuvantividade para a OVA. É interessante ressaltar que LAVELLE *et al.*, 2000, observaram efeito

imunogênico para a WGA na mucosa nasal somente depois de três doses imunizantes e utilizando a mesma metodologia que esses autores, a TEL demonstrou uma precocidade nesse efeito.

Caso o efeito adjuvante esteja associado à ligação com o receptor, convém salientar que os diferentes tipos celulares expressam receptores com diferentes arranjos sejam glicanos ou glicoconjugados, isso pode ditar o efeito adjuvante. Todavia, os mecanismos centrais para a atividade adjuvante são uma adequada apresentação do antígeno e a estimulação da produção de citocinas pelas células envolvidas.

Efeito da lectina de *T. esculenta* sobre os parâmetros biológicos dos carrapatos *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus*

A lectina de *Talisia esculenta* (TEL) foi ainda estudada em relação à possibilidade de interferência sobre a biologia de carrapatos parasitas de animais domésticos. As espécies de carrapatos envolvidas neste teste foram *Boophilus microplus*, parasita da espécie bovina e *Rhipicephalus sanguineus*, que parasita de cães. Fêmeas ingurgitadas (AMARAL, 1993) são um dos ínstares de escolha para os testes de sensibilidade a moléculas *in vitro*, feitos com a imersão de exemplares no tempo padrão de 5 minutos.

Inicialmente, doses em concentrações variáveis de 4 a 4000 mg/mL da lectina diluída em tampão fosfato foram preparadas para imersão das teleóginas de ambas as espécies de carrapatos, no intuito de se observar se o tratamento com a lectina seria capaz de interferir sobre a postura de ovos. O conhecimento sobre o desempenho biológico dos carrapatos gera informações sobre a dinâmica populacional e facilita a elaboração de estratégias de controle populacionais mais eficazes.

Os dados obtidos foram distribuídos em um gráfico de dispersão, a partir do qual foi traçada a linha de tendência que melhor representasse o fenômeno. O

modelo polinomial apresentou maior coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e, por este motivo, este modelo foi selecionado.

Os resultados das análises de regressão apresentados nas Figuras 14 e 15 para as espécies *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus*, respectivamente, demonstram que a massa total de ovos postos pelas teleóginas de *Boophilus microplus* foi afetada pelo tratamento com a lectina de *Talisia esculenta* (TEL) de modo dose-dependente. Existe uma correlação linear entre o tamanho, o peso das fêmeas e a sua capacidade de oviposição. (BENNET, 1974) Por essa razão a determinação do peso de conversão máximo em ovos nas várias espécies de ixodídeos é relevante para os testes de eficácia de qualquer produto. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9741 demonstra que a curva possui elevado poder de representação dos dados distribuídos no gráfico de dispersão. O mesmo teste, feito com teleóginas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, revelou não haver qualquer tipo de associação positiva ou negativa, entre o tratamento com lectina e a atividade de oviposição (Figura 16), uma vez que os dados se distribuíram irregularmente na área do gráfico, de modo que a melhor equação obtida apresentou  $R^2$  de apenas 0,5588. Assim, foi considerado que não ocorreu uma atividade biológica da lectina estudada, sobre a postura das fêmeas pertencentes à espécie *R. sanguineus*. Esses resultados refletem que existem diferenças entre as duas espécies de ixodídeos estudadas. Embora na literatura pertinente não tenham sido encontrados relatos sobre a composição da cutícula dessa espécie, certamente existem grandes diferenças estruturais, uma vez que as fases não parasitárias larvas, ninfas e adultos jovens, sobrevivem por longos períodos no ambiente, enquanto realizam a muda (ecdise). Essa peculiaridade inerente à evolução desse parasita permitiu que a estrutura cuticular assumisse uma organização de forma a minimizar o impacto provocado pelas alterações de temperatura, umidade relativa e pelo o uso indiscriminado de acaricidas, tornando-as mais resistentes.

A demonstração da atividade biológica da TEL, sobre a postura de ovos da espécie *B. microplus*, direcionou a investigação sobre a possibilidade desse efeito estar relacionado com o sítio carboidrato-ligante da lectina. Os resultados

demonstraram que a TEL pré-tratada com seus carboidratos ligantes, glucosemanose e N-Acetilglucosamina, foi inibida em sua ação, tendo sido observada uma redução de quase 40% da capacidade de postura do parasita. DAVEY *et al.*, 2001 e NASCIMENTO, 2003 obtiveram resultados semelhantes a este trabalho uma vez que o produto de fungos denominado *spinosad* e a lectina tóxica de *Solieria filiformis* produziram uma redução significativa no peso total da massa de ovos de fêmeas do carrapato *Boophilus microplus*, respectivamente. Essa lectina tem demonstrado efeito inseticida para as larvas de pragas agrícolas, tais como a do feijão (MACEDO *et al.*, 2000), outras lectinas específicas para resíduos de manose também demonstraram efeito inibitório sobre o desenvolvimento de estágios parasitários de artrópodos de plantas (FOISSAC *et al.*, 2000). FITCHES *et al.*, 1997; FITCHES & GATEHOUSE, 1998; FITCHES *et al.*, 2001 aventaram a possibilidade dessas proteínas se ligar a receptores carboidratos presentes nas células intestinais desses artrópodes e causar danos a essas estruturas.

A grande maioria dos insetos parasitas de plantas apresenta membrana peritrófica, no intestino médio organizada num arranjo de quitina (4-13%), embebida numa matriz composta de proteínas e carboidratos (21-51%) e resíduos de N-acetil-D-glucosamina (RICHARDS & RICHARDS, 1997). Diferentemente desses insetos os carrapatos possuem um exoesqueleto contendo quitina sob a forma de microfibrilas embebidas numa matriz proteico-lipídica (DILLINGER & KESEL, 2002). De um modo generalizado a cutícula de teleóginas da espécie *Boophilus microplus*, é muito hidrofóbica contendo apenas traços de proteínas hidrossolúveis (HACKMAN, 1982) e 3.8% de quitina (HACKMAN & GOLDBERG, 1985).

Em diferentes regiões brasileiras, mas utilizando as mesmas condições de laboratório, COSTA (1982); BITTENCOURT *et al.*, 1990; GLÓRIA *et al.*, 1993a e BORGES *et al.*, 2001, estudaram aspectos biológicos da fase não parasitária (teleóginas) de carrapatos e GLÓRIA *et al.*, 1993b, FLAUSINO *et al.*, 1995; MERLINI & YAMAMURA, 1998 e FURLONG, 1999 fizeram experimentos utilizando carrapaticidas comerciais. E todas essas pesquisas resultaram em dados muito variáveis em relação aos parâmetros biológicos estudados.

O tratamento da lectina com manose-glucose e N-Acetilglucosamina afetou de modo significativo a postura de ovos das teleóginas avaliadas, mas quando a lectina estava ligada aos açúcares, esse parâmetro era similar ao controle (Figura 16, Tabela 8). A TEL tem demonstrado efeito sobre o desenvolvimento de larvas dos bruchídeos do feijão *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* que foi totalmente abolido na presença do açúcar manose, enquanto que a glucose isoladamente inibiu parcialmente o peso e a sobrevivência dos mesmos. TRIGUÉROS *et al.*, 2000, também observaram uma diminuição do poder inseticida da lectina de *Lathyrus ochrus*, sobre as larvas de *Drosophila melanogaster*, quando esta foi associada a glucose o seu açúcar ligante.

O peso da quenógena (PQ) foi influenciado, tanto pela ação da lectina pura quanto pela sua associação com os carboidratos ligantes (Figura 17, Tabela 8). Esse parâmetro quando comparado ao peso inicial da fêmea reflete a capacidade de conversão dos nutrientes em ovos e isso repercute diretamente nos índices de eficiência reprodutiva (IER) e nutricional (IEN) (AMARAL, 1993).

A maior perda de peso foi observada nos parasitas do grupo controle (206,05 ± 41,53 gramas) e a menor perda foi verificada no grupo tratado com a TEL na dose de 400 mg/mL. Esses resultados são compreensíveis considerando-se que quanto maior a massa total de ovos postos, maior é a perda de peso da fêmea do carrapato e vice-versa. Assim, no tratamento em que houve a maior massa total de ovos postos, ou seja, no grupo controle, ocorreu também maior perda de peso da quenógena.

Provavelmente o tratamento com a lectina provocou a retenção nos ovos e isso proporcionou um aumento no peso das fêmeas tratadas, fato também constatado por NASCIMENTO, 2003, que utilizou a lectina da alga vermelha, *Soleria fiiformis*, em grupos de teleóginas de bovinos. Em experimentos dessa natureza a enterobactéria *Cedeca lapagei*, pode causar infecção da abertura genital, impedir a postura dos ovos e causar enegrecimento nos exemplares, que estão dentro dos ovos GLÓRIA *et al.*, 1993a. Em nenhuma das etapas, desta pesquisa, não foram observadas quaisquer indicativos desse tipo de infecção nas fêmeas.

Os grupos de teléginas tratados com a lectina associada aos açúcares apresentaram nível de postura maior que o grupo tratado com a TEL pura, NASCIMENTO 2003, encontrou resultados semelhantes em relação a lectina tóxica da alga *Soleria filiformis*.

No estudo da biologia de carrapatos, são utilizados os índices de eficiência reprodutiva (IER) e de eficiência nutricional (IEN) como indicativos do poder de proliferação dos parasitas e do comportamento do metabolismo nutricional sob condições de laboratório. Os valores encontrados para esses parâmetros, embora tenham sido numericamente semelhantes aos do grupo controle, demonstraram que não ocorreu interferência das associações lectina-carboidrato sobre o poder de proliferação, dado pelo IER (Figura 17, tabela 8) nem sobre o metabolismo nutricional, dado pelo IEN (Figura 18, Tabela 8). Esse mesmo comportamento foi detectado por NASCIMENTO, 2003, que utilizou a lectina da alga *S. filiformis*, em teléginas, provenientes dos mesmos bovinos e da mesma região geográfica de Fortaleza, utilizados nesta pesquisa. Isso pode ser explicado pelo fato de que a variação estacional influencia o IER de fêmeas de carrapatos mesmo que elas tenham sido submetidas a condições controladas em laboratório, uma vez que as mesmas viveram o seu ciclo biológico completo sobre seu hospedeiro. BORGES *et al.*, 2001, estudando o comportamento de colônias de carrapatos *B. microplus*, coletadas de bovinos e em seguida mantidas em laboratório, para postura, encontraram grande variabilidade do IER, a qual atribuíram as diversidades climáticas na dependência dos períodos seco ou chuvoso.

A utilização de produtos químicos que contaminam, intoxicam, geram desequilíbrio ecológico (SAITO & LUCCHINI, 1998) e resistência (GALLO *et al.*, 2002), ainda tem sido o recurso mais utilizado no combate às pragas sejam agrícolas ou parasitas de animais.

PUSZTAI *et al.*, 1990, observaram que dependendo da afinidade por receptores carboidratos e da resistência a proteólise pelas enzimas intestinais dos insetos, as lectinas poderiam se ligar em partes intestinais diferentes, causando-lhes alterações morfo-funcionais.



Nos anos mais recentes outras pesquisas demonstraram que as lectinas e algumas *lectina-like* presentes nos vegetais podem protegê-los contra a ação de predadores e de pragas (MACEDO *et al.*, 1995; CARLINI *et al.*, 1997; FITCHES *et al.*, 1997; FITCHES & GATEHOUSE, 1998; MACEDO *et al.*, 2000 e MACHUKA *et al.*, 2000).

Lectinas com afinidade para resíduos de manose inibiram o desenvolvimento de estágios parasitários pertencentes às ordens *Coleoptera*, *Lepidoptera* e *Homoptera* (FOISSAC *et al.*, 2000). Tendo sido observado que, essas proteínas podem ligar-se a receptores carboidratos presentes nas células intestinais dessas classes de insetos e causar danos (FITCHES *et al.*, 1997; FITCHES & GATEHOUSE, 1998; FITCHES *et al.*, 2001).

Os mecanismos de ação dessas proteínas sobre os estágios parasitários dos insetos, ainda não estão completamente elucidados. É conhecido que essas moléculas fazem ligação com *receptores* presentes no epitélio intestinal o que pode modular os efeitos subseqüentes (POWELL *et al.*, 1998). Particularmente, as lectinas podem se ligar à membrana peritrófica. Essa membrana é organizada num arranjo de quitina (4-13%), embebida numa matriz composta de proteínas e carboidratos (21-51%) e resíduos de N-acetil-D-glucosamina, e reveste as células do terço médio do intestino de alguns dos insetos fitófagos (RICHARDS & RICHARDS, 1997). Uma vez ligada a essa membrana, uma lectina pode interferir no processo de digestão e absorção do inseto (ZHU *et al.*, 1996) ou no processo de formação da membrana e penetrar nas microvilosidades permitindo a destruição do intestino pelo material de ingesta (HARPER & HOPPINKS, 1997; HARPER *et al.*, 1998).

FITCHES *et al.*, 2001, observaram que a ligação das lectinas GNA e Con A com as microvilosidades e a membrana peritrófica permitiu a passagem de proteínas do intestino para os túbulos de *Malpighi*, na larva do tomate, *Lacanobia oleracea*, sugerindo que ambas as lectinas exerciam efeitos sistêmicos nessa praga.

A lectina de *Talisia esculenta* (TEL), específica para resíduos de manose-glucose, quando usada nas concentrações 0.5-2.0% (w/w) em sementes artificiais,

apresentou efeito inseticida para as larvas de *Calosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus* (MACEDO *et al.*, 2000). Essa lectina também demonstrou resistir às enzimas digestivas desses insetos (MACEDO *et al.*, 2002; FREIRE, 2003).

Captação da lectina de *T. esculenta* conjugada na cutícula dos carrapatos *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* através de fluorescência.

A técnica de fluorescência foi utilizada para detectar a presença da lectina de *T. esculenta* na cutícula, no ovário e nas células intestinais das espécies ixodidas estudadas (Figuras 20 e 21).

Somente a cutícula da espécie *Boophilus microplus* apresentou fluorescência disseminada no idiossoma (Figura 21 A). Essa é uma área menos espessa e esclerotizada do exoesqueleto ixodida e nela existe grande quantidade de quitina (HACKMAN, 1982, HACKMAN & GOLDBERG, 1985). Possivelmente a TEL ligou-se à matriz de quitina, que compõe a cutícula e como resultante dessa ligação, ocorreram as alterações no ovário, que provocaram a retenção dos ovos. Esse efeito provocou a redução de quase 40% na postura das telóginas do carrapato *Boophilus microplus*.

Não foi evidenciada fluorescência na cutícula das fêmeas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, quando as mesmas foram tratadas com a lectina de *Talisia esculenta* associada a FITC. É importante frisar que, ainda que, os carrapatos apresentem características filogenéticas comuns, existem diferenças na biologia, no tipo de hospedeiro e no arranjo estrutural das cutículas entre as várias espécies parasitas de animais. Razão pela qual este estudo não encontrou efeitos sobre os parâmetros biológicos, do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* utilizando a lectina de *Talisia esculenta*, em solução aquosa na forma de banhos de imersão. Essa prerrogativa é merecedora de investigações futuras. A começar pela busca da composição estrutural da cutícula desses artrópodes ou o tratamento da cutícula utilizando substâncias que exponham os carboidratos e a

realização de novos testes com a lectina dissolvida em outras soluções, uma vez que a cutícula dos carrapatos é extremamente hidrofóbica.

## 7. CONCLUSÕES

A lectina de *Talisia esculenta* (TEL) apresentou imunogenicidade quando foi administrada tanto pela via subcutânea quanto pela via nasal.

A administração da lectina de *Talisia esculenta* (TEL) associada aos seus açúcares ligantes (manose-glucose e N-acetil-D-Glucosamina) não produziu efeito imunogênico nem na via subcutânea nem na via nasal.

A injeção da lectina de *Talisia esculenta* (TEL) associada à ovalbumina produziu efeito adjuvante somente quando administrada pela via subcutânea.

A administração da lectina de *Talisia esculenta* (TEL) associada à ovalbumina não gerou efeito adjuvante na via nasal.

Os parâmetros biológicos do carrapato dos bovinos *Boophilus microplus*: peso da massa total de ovos postos (PMOT), peso da quenógena (PQ), bem como os índices de eficiência reprodutiva (IER) e nutricional (IEN) foram afetados pelo tratamento de teléoginas desse carrapato com a lectina de *Talisia esculenta* (TEL)

O tratamento das teleóginas do carrapato dos bovinos *Boophilus microplus* com a lectina de *Talisia esculenta* (TEL) associada aos seus açúcares ligantes (manose-glucose e N-acetil-D-Glucosamina) aboliu o efeito dessa lectina sobre o peso da

massa total de ovos postos (PMOT), peso da quenógena (PQ), mas não afetou os índices de eficiência reprodutiva (IER) e nutricional (IEN).

O tratamento das teleóginas do carrapato dos caninos *Rhipicephalus sanguineus* com a lectina de *Talisia esculenta* (TEL) não afetou os seus parâmetros biológicos: peso da massa total de ovos postos (PMOT), peso da quenógena (PQ) e os índices de eficiência reprodutiva (IER) e nutricional (IEN).

Somente foi detectada fluorescência na cutícula do carrapato dos bovinos *Boophilus microplus* quando a mesma foi incubada com a lectina de *Talisia esculenta* (TEL) associada à FITC, indicando que a lectina ligou-se provavelmente aos açúcares presentes na cutícula dessa espécie.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., POBER, J. S. - Hipersensibilidade imediata. In: **Imunologia Celular e Molecular**. 4ª Edição. Editora Livraria Revinter, p424-444, 2002.

AGUILAR-TIPACAMU, G., RODRIGUEZ-VIVAS, R. I. Effect of moxidectin against natural infestation of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae) in the Mexican tropics. **Veterinary Parasitology** 111: 211- 216, 2003.

ALBUQUERQUE, D., A., MARTINS, G. A., CAMPOS-NETO, A. AND SILVA, J., S. - The adjuvant effect of jacalin on the mouse humoral immune response to trinitrophenyl and *Trypanosoma cruzi*. **Immunology Letters** 68: 275-381, 1999.

ALENCAR, N. M. N - Atividade inflamatória e pró-inflamatória de lectinas vegetais. Tese de Mestrado, UFC, pp 81, 1997.

ALENCAR, N. M. N - Estudo do mecanismo e mediadores químicos envolvidos na atividade pró-inflamatória de lectinas de sementes de *Vatairea macrocarpa* e *Dioclea violacea*. Tese de Doutorado, UFC, pp 123, 2001.

ALENCAR, N. M. N.; TEIXEIRA, E. H, ASSEREUY, A. M. S.; CAVADA, B. S.; FLORES, C. A., RIBEIRO, R. A. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leucocyte recruitment. **Mediators of Inflammation** 8: 107 – 113, 1999.

AMARAL, N. K. Guidelines for the evaluation against the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. 2:144-151, 1993.

ANDEREG, P. I, Passos, L. M. F. Erliquiose canina-revisão. **Clínica Veterinária**.12:31-38, 1999.

ANDRADE, J. L., ARRUDA, S., BARBOSA, T., PAIM, L., RAMOS, M. V., CAVADA, B. S., BARRAL-NETTO, M. Lectin-induced nitric oxid production. **Cellular Immunology** 194: 98 – 102, 1999.

ANGUITA, J., HEDRICK, M.N and FIKRIG, E. 2003. Adaptation of *Borrelia burgdoferi* in the tick and the mammalian host. (Review article) **FEMS Microbiology** 27:493-504.

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 of inflammation** 6: 201 – 210; 1997.

BANCHEREAU, J., STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature** 392 : 245-252, 2003.

BANCHONGLIKITKUL, C., SMART, J. D., GIBBS, R. V., COOK, D. J. Binding of some *Diocleinae* lectins to the mucosal surfaces of the eye and mouth. **British Journal of Biomedical Science** 57: (1) 7 – 12, 2000.

BARRAL-NETO, M.; SANTOS, S., BARRAL, A ; MOREIRA, L., M.; SANTOS, C. F.; MOREIRA, R.,A.; OLIVEIRA, J.,T.,A AND CAVADA, B.,S.- Human lynfocite stimulation by legume lectins from the Diocleae tribe. **Immunological Investigation** 21: 297-303, 1992.

BARRAL-NETO, M.; VON SOHSTEN, R., R. TEIXIERA, M., CONRADO DOS SANTOS, W.,

L., POMPEU, M., L., MOREIRA, R.,A., OLIVEIRA, J.,T., CAVADA, B., S., FALCOFF, E. AND BARRAL, A - In vivo protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta tropica** 60: 237-250, 1996.

BARJA-FIDALGO, C., CARLINI, R.C., GUIMÃRÃES, J.G., FLORES, C. A., CUNHA, F.Q. & FERREIRA, S. H. Role of resident macrophages in canatoxin-induced in vivo neutrophil migration. **Inflammation** 16:1, 1992.

BEAULIEU, S., ROBBIANI, D. E., DU, X., RODRIGUES, E., IGNATUS, R., WEI, Y. Expression of a functional eotaxin ( CC chemokine ligand 11 ) receptor CCR3 by human dendritic cells. **Journal Immunology** 169: 2925-2936, 2002.

BELLOCCHIO, S., MONTAGNOLI, C., BOZZA, S., GAZIANO, R., ROSSI, G., MAMBULA, S. S. The contribution of the toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. **Journal Immunology** 172 : 3059-3069, 2004.

BENTO, C. A.M., CAVADA, B. S., OLIVEIRA, J. T. A., MROEIRA, R.A., BARJA-FIDALGO, C. Rat paw edema and leukocyte emmigration induced by plant lectins. **Agents Actions** 38:48-54, 1993.

BERGER, A. C. ALEXANDER, H. R., WU, P. C. Tumor necrosis factor receptor I (p55) is upregulated on endothelial cells by exposure to the thumor-derived cytokine endothelial monocyte-activating polypeptide II (EMAP-II). **Citokine** 12: 992-1000, 2000.

BEVILACQUA, M. P., NELSON, R.M., MANNORI, G. Endotelial-leuckocyte adhesion



molecules in human disease. **Annual Review of Medicine** 45: 361-378, 1994.

BIANCHI, M. W., BARRÍ, N., MESSAD, S. Factors related to cattle infestation level and resistance to acaricides in *Boophilus microplus* tick population in New Caledonia. **Veterinary Parasitology** 112: 75-89, 2003.

BLASCO, E. BARRA, A., NICOLAS, M., LECRON, J.C. WIJDENES, J., PREUDHOME, J. L. Proliferative response of human CD4+ T lymphocytes stimulated by the jacalin. **European Journal of Immunology** 25: 2010-2018, 1995.

BRADFORD, M. M., A Rapid Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, 72; 248-254 1976.

BRETTSCHWERDT, E. B., HERGALY, B. C., HANCOCK, S. T. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *E. Chaffeensis*, *E. equi*, *E. ewingii* or *Bartonella vinsonii*. **Journal of Clinical Microbiology**. 36:2645-2651, 1998.

BRINCK, U., BOSBACH, R., KORABIOWSKA, M., SCHAUER, A., GABIUS, H.J. Histochemical study of expression of lectin reactive carbohydrate epitopes and glycoligand-binding sites in normal human appendix vermiformis, colonic mucosa, acute appendicitis and colonic adenoma. **Histology and Histopathology** 11(4): 919-930, 1996.

BOONSTRA, A., ASSELIN-PATUREL, C., GILLIET, M., CRAIN, C., TRINCHIERI, G., LIU, Y. J. Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. **Journal Experimental Medical** 197: 101- 109, 1999.

BUCKLEY, M., XIN, P., WASHINGTON, S., HERB, N., ERICKSON, D., BHAVANADAN, V. P. Lectin histochemical examination of rabbit bladder glycoproteins and characterization of a mucin isolated from the bladder mucosa. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 375: (2) 270 – 277, 2000.

CAMELO, S., SHANLEY, A., VOON, A. S., MCMENAMIN, P.G. The distribution of antigen in lymphoid tissues following its injection into the anterior chamber of the rat eye. **Journal Immunology** 172: 5388-5395, 2004.

CANALES, M., ENRÍQUEZ, A., RAMOS, E., CABRERA, D., DANDIE, H., SOTO, A., FALCÓN, V., RODRÍGUEZ, M. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac™ against cattle tick. Article. **Vaccine**.15:414-422, 1997.

CARLINI, C. R., GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon** 40: 1515-1539, 2002.

CARRENO, B. M., COLLINS, M. The B7 family of ligands and its receptors : new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. **Annual Review Immunology** 20: 29-53, 2002.

CARROLD, M. C., PRODEUS, A. P. Linkages of innate and adaptive immunity. **Current Opinion in Immunology** 10: 36-40, 1998.

CASTELLA ESPUNY, J., GUTIERREZ GALINDO, J., ESTRADA PENÀ, A, MUNOZ LOPEZ, E. Actividad ovicida de diversos compuestos acaricidas sobre puesta de la garrapata del perro *Rhipicephalus sanguineus*, Latrelle (acari: Ixodidae). **Medicina Veterinária** 11:306-401, 1994.

CAUX, C., AIT-YAHIA, S., CHEMIN, K., DE BOUTELLIER, O., DIEU-NOSJEAN, M. C., HOMEY, B. Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. **Springer Seminary Immunopathology** 22: 345-369, 2000.

CHROUSOS, G. P. Glucocorticoid action networks-na introduction to systems biology [comment]. **Journal Clinical Endocrinology Metabolism** 89: 563-564, 2004.

CLARK, M. A., HIRST, B. H., JEPSON, M. A. Lectin-mediated mucosal delivery of drugs and microparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews** 43: 207 – 223, 2000.

DABBAGH, K., DAHL, M. E., STEPICK-BIEK, P., LEWIS, D. B. Toll-like receptor 4 is required for optimal development of Th2 immune responses: role of dendritic cells. **Journal Immunology** 168: 4524-4530, 2000.

DANTAS, M. C., NUNES-PINHEIRO, D. C. S., ALBUQUERQUE, D. A., MOURÃO, R. H. V., MELO, D. F., LIMA, M. S. Immunogenicity and modulatory effect of the lectin from *Artocarpus heterophyllus* (Jackfruit) seeds, artocarpin and jacalin. **Acta Farmacéutica Bonaerense** 19: (2) 109 – 113, 2000.

DAUGSCHIES,A AND JOACHIM,A .1999. Eicosanoids in parasites and parasitic infections. Review Article. **Advances in Parasitology**.46:181-240.

DAXECKER, H., RAAB, M., MARKOVIC, S., KARINI, A., GRIESMACHER, MUELLER, M. M. Endothelial adhesion molecule expression in na *in vitro* model of inflammation. **Clinica Chimica Acta** 325:171-175, 2002.

DE JONG, E. C., VIEIRA, P. L., KALINSK, P., SCUITEMARKER, J. H., TANAKA, Y.,

WIERENGA, E. A. Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. **Journal Immunology** 168: 1704-1709, 2002.

DESLEE, G., CHARBONNIER, A. S., HAMMAD, H., ANGYALOSI, G., TILLIE-LEBLOND, L., MANTOVANI, A. Involvement of the mannose receptor in the uptake of Der p 1, a major mite allergen, by human dendritic cells . **Journal Allergy Clinical Immunology** 110: 763-770, 2002.

DIMMOCK, NJ. Neutralization of animal viruses. **Current Tropical Microbiology and Immunology**, 183: 1-149, 1993.

EDWARDS, J.C.W., SEDGCICK, A. D., WILLOUGHBY, D. A. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of air an *in vivo* tissue culture system. **Journal of Pathology**, 134: 147-156, 1981.

EISENBARTH, S. C., PIGGOTT, D. A., HULLEAT, J. W., VISITIN, I., HERRICK, C. A., BOTTOMLY, K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4 – dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. **J Exp Med** 196: 1645-1651, 2002.

EZAKI, T., BALUK, P., THURSTON, G. L. A., BARBARA, A., WOO, C. & McDONALD, D.M. Time course of endothelial cell proliferation and microvascular remodeling in chronic inflammation. **American Journal of Pathology** 158(6): 2043-2055, 2001.

FEARON, D. T., LOCKSLEY, R. M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. **Science** 272: 50-53, 1996.

FISCHER, E.; KHANG, N. Q., BROSSMER, R. The alpha-galactosyl specific lectin from *Artocarpus intergrifolia* distinguishes between two lymphoma lines with different metastatic potential. **Biochemistry and Cell Biology** 75: (2) 171 – 175, 1997.

FRANC, M., CARDIEGUES, M. C. Activity of a deltamethrin shampoo against *Ctenocephalides felis* and *Rhipicephalus sanguineus* in dogs. **Veterinary Parasitology** 81:341-346, 1999.

FREIRE, M.G.M. Iaolamento, caracterização físico-química e estudo das atividades inseticida, microbicida e inflamatória da lectina de sementes de *Talisia esculenta* (St. Hill) Radlk. Universidade Estadual de Campinas. Depto. De Bioquímica, 189p, 2003.

FREIRE, M.G.M., DESOUZA, I.A, SILVA, A. C. M., MACEDO, M. L. R., LIMA, M.G.S., TAMASHIRO, W.M.S.C., ANTUNES, E., MARANGONI, S. Inflammatory responses induced by *Talisia esculenta* seeds lectin in mouse. **Toxicon** :02-205, 2002.

FREIRE, M.G.M., MACHADO, O.L.T., SMOLKA, M.B., NOVELLO, J.C., MARANGONI, S., MACEDO, M. L. R., 2001. Isolation and characterization of isolectins from *Talisia esculenta* seeds. **Journal Protein Chemistry** 20(6), 495-500.

GADJEVA, M., THIEL, S., JENSENIUS, J. C. The mannan-binding-lectin pathway of the innate immune response. **Current Opinion Immunology** 13: 74-78, 2001.

GAGLIARDI, M. C., SALLUSTO, F., MARINARO, M., LANGENKAMP, A., LANZAVECCHIA, A., DE MAGISTRIS, M. T. Cholera toxin induces maturation of human dendritic cells and

licences them for Th2 priming. **European Journal of Immunology** 30: 2394-2403, 2000.

GAJEWSKA, B. U., SWIRSKI, F. K., ALVAREZ, D., RITZ, S. A., GONCHAROVA, S., CUNDALL, M. Temporal –spatial analysis of the immune responses in a murine model of ovalbumin-induced airway inflammation. **American Journal Respiratory Cellular Molecular Biology** 25: 326-334, 2001.

GAMBA, G., BONARINO, P., GONZALEZ-VIDELA, R., BENEDETTI, R., CAVALIERI, H., COURREGES, M. C. Nitric oxide modulation of the immune response against cholera toxin-  
adjuvated ovalbumin administered by the intranasal route. **Immunology Letters**, 2004.

GARLANDA, C., HIRSCH, E., BOZZA, S., SALUSTRI, A., DE ACETIS, M., NOTA, R. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in antifungal innate immune response. **Nature** 420: 182-186, 2002.

GELMAN, A. E., ZHANG, J., CHOI, Y., TURKA, L. A. Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4 T cell survival. **J Immunol** 172: 6065-6073, 2004.

GERMAIN, R. N., JENKINS, M. K. In vivo antigen presentation . **Curr Opin Immunol** 16: 120-125, 2004.

HARRISON, B. A, ENGBERG, B. R, APPERSON, C. S. Ticks (Acari:Ixodidae) uncommonly found biting humans in North Carolina. **Journal of Vector Ecology** 22:6-12, 1997.

HOCHREIN, H., O'KEEFFE, M., LUFT, T., VANDENABEELE, S., GRUMONT, R. J., MARASKOVSKY, E. Interleukin IL-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12

production by mouse and human dendritic cells. **Journal Experimental Medicine** 192: 823-833, 2002.

HOFFMANN, J. A., KAFATOS, F.C., JANEWAY, C. A., EZEKOWITZ, R. A. Phylogenetic perspectives in innate immunity. **Science** 284: 1313-1318, 1999.

HUDSON, D. L. SLEMAN, J., WATT, F. M. CD 44 is the major peanut lectin-binding glycoprotein of human epidermal keratinocytes and plays a role in intercellular adhesion. **Journal of Cellular Science** 108: 1959 – 1970, 1995.

HYNES, R. O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. **Cell** 110: 673-687, 2002.

IAN, F., PUSZTAI, A., BARDOCZ, S & EWEN, S.W.B.- A combination of dietary protein depletion and PHA-induced gut growth reduce the mass of a murine non-Hodgkin lymphoma. **Cancer Letters** 101: 239-245, 1999.

ITANO, A. A., JENKINS, M. K. Antigen presentation to naive CD4 T cells in lymph node. **Nature Immunology** 4: 733-739, 2003.

KABIR, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. **Journal of Immunological Methods** 212: 193 - 211, 1998.

KANSAS, G. S. Selectins and their ligands: Current concepts and controversies. **Blood** 88: 3259 – 3287, 1996.

KELSALL, B. L., STUBER, E., NEURATH, M., STROBER, W. Interleukin-12 production by dendritic cells . The role of CD40 – CD40L interactions in Th1 T-cell responses. **Annual N Y Science** 795: 116-126, 1996.

KEYHANI, K., SCHERER, P. W., MOZELL, M. M. A numerical model of nasal odorant transport for the analysis oh human olfaction. **Journal of Theoretical Biology**, 1997.

KIKUCHI, T., CRYSTAL, R. G. Antigen-pulsed dendritic cells expressing macrophage-derived chemokine elicit Th2 responses and promote specific umoral immunity. **Journal Clinical Investigation** 108: 917-927, 1997.

KILPATRICK, D. C. Mechanisms and assessment of lectin-mediated mitogenesis. **Molecular Biotechnology** 11: (1) 55 – 65, 1999.

KLEIN, A., CUNHA F.Q. & FERREIRA, S.H.- The role of lymphocytes in the neutrophli migration induced by ovalbumin in immunized rats. **Immunology** 84: 577-584, 1995.

KIM, C. H., NAGATA, K., BUTCHER, E. C. Dendritic cells support sequential reprogramming of chemoattractant receptor profiles during naive to effector T cell differentiation. **Journal Immunology** 171: 152-158, 2003.

KOSSOWSKA, B., LAMER-ZARAWSKA, E., OLCZAK, M., KATNIK-PRASTOWSKA, I. Lectin from *Beauveria bassiana* mycelium recognizes Thomson-Friedenreich antigen and related structures. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 123: 23 – 31, 1999.

JACOBS-LORENA, M. AND LEMOS, F. J. A. Immunological strategies for control of insect



disease vectors: a critical assessment. Review Article. **Parasitology Today** 11:144-147, 1995.

JENSENIUS, M., FOURNIER, P.E. & RAOULT, D. 2004. Tick-borne rickettsioses in international travellers. (Review Article) **International Journal of Infectious Diseases** 8:139-146.

Jl, J. Y., DIAMOND, S. L. Exogenous nitric oxide activates the endothelial glucocorticoid receptor. **Biochemica and Biophysical Research Communications** 318: 192-197, 2004.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature** 227:679-685, 1970.

LAVELLE, E. C., GRANT, G., PUSZTAI, A., PFULLER, U., O'HAGAN, D. T. Mucosal immunogenicity of plant lectins in mice. **Immunology** 99: 30 – 37, 2000.

LAVELLE, E. C., PUSZTAI, A., PFULLER, U., O'HAGAN, D. T.- The identification of plant lectins with mucosal adjuvant activity. **Immunology**, 102: 77 – 86, 2001.

LE PAGE, C., GENIN, P., BAINES, M. G., HISCOTT, J. Interferon activation and innate immunity. **Review Immunogenetic** 2: 374-386, 2000.

LEMOS, E.R., MACHADO, R.D., COURA, J.R., GUIMARÃES, M., FREIRE, N.M., AMORIM, M., GAZETA, G.S. Epidemiological aspects of the Brazilian spotted fever:seasonal activity of ticks collected in na endemic area in São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**.30:181-185,1995.

LEMOS, E.R., MACHADO, R.D., PIRES, F.D., MACHADO, S.L., COSTA, L.M., COURA, J.R. Rickettsiae-infected ticks in na endemic area of spotted fever in the State of Minas Gerais.

Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 92:477-481, 1997.

LIS, H., SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, 98 (2); 637 – 675, 1998.

LIU, Y. J. Dendritic cell subsets and lineages, and their function in innate and adaptive immunity. **Cell**. 106: 259-262, 2003.

LOHR, J., KNOECHEL, B., JIANG, S., SHARPE, A. H., ABBAS, A. K. The inhibitory function of B7 costimulators in T cell responses to foreign and self-antigens. **Nature Immunology** 4: 664-669, 2003.

LUKAS, N. W., HOGABOAM, C., CAMPBELL, E., KUNKEL, S. L. Chemokines: function regulation and alteration of inflammatory responses. **Chemistry Immunology** 72: 102-120, 1999.

LUNDY, S. K., BERLIN, A. A., LUKACS, N. W. Interleukin-12-independent down-modulation of cockroach antigen-induced asthma in mice by intranasal exposure to bacterial lipopolysaccharide. **American Journal of Pathology** 163: 1961-1968, 2003.

MACEDO, M. L. R., FREIRE, M.G.M., NOVELLO, J.C., MARANGONI, S. *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, 1571: 83-88, 2002.

MARTINEZ, S. Clinical perspective in canine joint disease. In: **The North American Veterinary Conference**, p. 34, 2001.

McGREAL, E. P., MARTINEZ-POMARES, L., GORDON, S. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. **Molecular Immunology** 41: 1109-1121,

2004.

McKAY, L. I., CIDLOWSKI, J. A. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor  $\kappa$ B and steroid receptor-signaling pathways. **Endocrinology**. Review. 20(4): 435-459, 1999.

MONIS, P.M., ANDREWS. R.H. AND SAINT, C.P. 2002. Molecular biology techniques in parasite ecology. Article. **International Journal of Parasitology**.32:551-562.

MOREIRA, R. A. Lectinas Vegetais: Uma Abordagem Química e Físico-Química. Tese de Titular. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará. 600 p., 1998.

MULENGA, A., SUGIMOTO,C. AND ONUMA,M. 2000. Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potencial candidate vaccine antigens. Article. **Microbes and Infection** 2:1351-1361.

MUNN, D. H., SHARMA, M. D., MELLOR, A. L. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4 (+) T cells triggers indoleamine 2,3 – dioxygenase activity in dendritic cells. **Journal Immunology** 172: 4100-4110, 2004.

MURAILLE, E., PAJAK, B., URBAIN, J., LEO, O. Carbohydrate-bearing cell surface receptors involved in innate immunity: interleukin-12 induction by mitogenic and nonmitogenic lectins. **Cellular Immunology** 191: 1-9, 1999.

NASCIMENTO, A.E. Isolamento e purificação da lectina tóxica da alga vermelha *Soleira*

*filiformis* e efeito contra o carrapato dos bovinos. Tese de Doutorado. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará. Depto. De Bioquímica. 198 p. 2003.

NATHAN, S. & LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Scientific American**, 74-81, 1993.  
NI, Y., TIZARD, I. Lectin-carbohydrate interaction in the immune system. **Veterinary Immunology and Immunopathology** 55: 205-223, 2004.

NISHIMURA, A., SAWADA, S., USHIYAMA, I., YAMAMOTO, Y., NAKAGAWA, T., TANEGASHIMA, A., NISHI, K. Lectin-histochemical detection of degenerative glycoconjugate deposits in human brain. **Forence Science International**. 113: 265 – 269, 2000.

OLIVEIRA, F. A., VIEIRA-JUNIOR, G. M., CHAVES, M. H. ALMEIDA, F. R. C., FLORENCIO, M. G., LIMA JR., R. C. P., SILVA, R. M. SANTOS, F. A., VIETLA S.N. RAO. Gastroprotective and Anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. **Pharmacological Research**, 49: 105-111, 2004.

PARENTE, L., SOLITO, E. Annexin 1: more than an anti-phospholipase protein. **Inflammation Research** 53: 125-132, 2004.

PEELER, E. J. AND WANYANGU, S. W. Infectious causes of small ruminant mortality in Kenya. Article. **Small Ruminant Research**. 29:01-11, 1998.

PERRY, B. D. AND YOUNG, A S. The past and future roles of epidemiology and economics in the control of tick-borne diseases of livestock in Africa: the case of theilerioses. Article. **Preventive veterinary Medicine**. 25: 107-120, 1995.

PETERSEN, S. V., THIEL, S., JENSENIUS, J. C. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. **Molecular Immunology** 38: 133-149, 2001.

PETROVIC, S. D., DOBRIC, S., BOKONJIC, D. NIKETIC, M., PIÑERES. A., G., MERFORT, I. Evaluation of *Tanacetum larvatum* for an Anti-inflammatory activity and for the protection against indomethacin-induced ulcerogenesis in rats **Journal of Ethnopharmacology** 87: 109-113, 2003.

PUCHE, A. C., POIRRIER, F., HOUR, M., KEY, B. Role of galectin 1 in the developing mouse olfactory system. **Developmental Biology** 179: 274-287, 1996.

PULENDRAN, B., SMITH, J. L., CASPARY, G., BRASEL, K., PETTIT, D., MARASKOVSKY, E. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. **Proceeding Nat Academic Science U S A** 96: 1036-1041, 1999.

REMMELINK, M. DARRO, F. DECAESTECKER, C. DE DECKER, R. BOVIN, N. V. GEBHART, M., KALTNER, H. GABIUS, H-J., KIS, R. SALMON, I. & DANGUY, A.- In vitro influence of lectins and neoglycoconjugates on the growth of three human sarcoma cell lines. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology** 125(5): 275-285, 1999.

RICHTER, A., PUDDICOMBE, S. M., LORDAN, J. L., BUCCHIERI, F., WILSON, S. J., DJUKANOVIC, R. The contribution of interleukin IL-4 and IL-13 to the epithelial-mesenchymal trophic unit in asthma. **American Journal of Respiration Cellular and Molecular Biology** 25: 385-39, 2001.

RIEDERMANN, N., NEFF, T., GUO, R., BERNACKI, K., LAUDES, I., SARMA, J., LAMBRIS, J. WARD, P., Protective effects of IL-6 blockade in sepsis are linked to reduced C5a receptor expression. **Journal of Immunology** 170: 503-507, 2003.

ROBINSON-RECHAVI, M., CARPENTIER, A. S., DUFFRAISSE, M., LAUDET, V., How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? **Trends Genetic** 17(10): 554-556, 2001.

ROSSI, D., ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annual Review Immunology** 18: 217-242, 2000.

ROOST, H. P., BACHMANN, M. F., HAAG, A., KALINKE, U., PLISKA, V. Early high-affinity neutralizing anti-viral IgG responses without further overall improvements of affinity. **Proceeding Nat Academic Science USA** 92: 1257-1261, 1995.

RUDD, P. M., WORMALD, M. R., DEVEK, R. M. Sugar-mediated ligand-receptor interactions in the immune system. **Trends in Biotechnonology** 2004.

RUEDL, C., BACHMANN, M. F., KOPF, M. The antigen dose determines T helper subset development by regulation of CD40 ligand. **European Journal Immunology** 30: 2056-2064, 2000.

SABINE, A., KALTNER, H., SUBERT, H. The sugar code : functional lectinomics. **Biochimica et Biophysica Acta** 1572: 165-177, 2002.

SALLUSTO, F., LANZAVECCHIA, A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic

through the analysis of chemokine receptor expression. **Immunology Review** 177: 134-140, 2000.

SAMISH, M. AND GLAZER, I 2001. Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. Review Article. **Trends in Parasitology**.17:368-371.

SCHNARE, M., BARTON, G. M., HOLT, A. C., TAKEDA, K., AKIRA, S., MEDZHITOV, R. Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. **Nature Immunology** 2: 947-950, 2001.

SCHWIEBERT, L. A., BECK, L. A., STELLATO, C., BICKEL, C. A., SCHLEIMER, R. P. Glucocorticóides inhibition of cytokine production:Relevance to antiallergic actions. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 97: 143-152, 1996.

SELL, A.M., COSTA, C.P. Effects of plants lectins on in vitro fibroblast proliferation. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 46(3): 349-354, 2003.

SHERBINI, H. E., HOCK, B., FEARNLEY, D., MCLELLAN, A., VUCKOVIC, S., HART, D. N. J. Lectin ligands on human dendritic cells and identification of a peanut agglutinin positive subset in blood. **Cellular Immunology** 200: 36 – 44, 2000.

SHINAGAWA, K., ANDERSON, G. P. Rapid isolation of homogeneous murine bronchoalveolar lavage fluid eosinophils by differential lectin affinity interaction and negative selection. **Journal of Immunological Methods** 237: 65 – 72, 2000.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos** (Métodos Químicos e Biológicos). Viçosa. UFV, Imprensa Universitária, 165p, 1990.

SINGH, R. S., TIWARY, A. K., KENEDY, J. K. Lectins: sources, activities and applications. **Critical Reviews in Biotechnology** 19: (2) 145 – 178, 1999.

SKOOG, C. G., KAIN, K. C., JACKSON, H. G., RAVDIN, J. I. A recombinant cysteine rich section of *E. Histolytica* galactose inhibitable lectin efficacious as subunit vaccine in Gebril model of amoebic liver abscess. **Journal of Infectious Diseases** 171: 156 – 645, 1995.

SMART, J. D., NICHOLLS, T. J., GREEN, K. L., ROGERS, D. J., COOK, J. D. Lectins in drug delivery: a study of the acute local irritancy of the lectins from *Solanum tuberosum* and *Helix pomatia*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** 9: 93 – 98, 1999.

SMITH, P. J., COUSINS, D. J., JEE, Y. K., STAYNO, D. Z., LEE, T. H., LAVENDER, P. Suppression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression by glucocorticoids involves inhibition of enhancer function by the glucocorticoid receptor binding to composite NF-AT/activator protein-1 elements. **Journal Immunology** 167: 2502-2510, 2001.

SMOAK, K. A., CIDLOWSKI, J. A. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. **Mechanisms of Ageing and Development** 125: 697-706, 2004.

SO, T., SALEK-ARDAKANI, S., NAKANO, H., WARE, C. F., CROFT, M. TNF receptor-associated factor 5 limits the induction of Th 2 immune responses. **Journal Immunology** 172: 4292-4297, 2004.

SMART, J. D., NICHOLLS, T. J., GREEN, K. L., ROGERS, D. J., COOK, J. D. Lectins in drug



delivery: a study of the acute local irritancy of the lectins from *Solanum tuberosum* and *Helix pomatia*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences** 9: 93 – 98, 1999.

SONENSHINE, D. E. 1991. **The Biology of Ticks** 1. Oxford University Press, New York.

SONENSHINE, D.E. 1993. **The Biology of Ticks** 2. Oxford University Press. New York.

STRAW, A. D., MACDONALD, A. S., DENKERS, E. Y., PEARCE, E. J. CD154 plays a central role in regulating dendritic cell activation during infections that induce Th1 or Th2 responses. **Journal Immunology** 170: 727-734, 2003.

STUMBLES, P. A., STRICKLAND, D. H., PIMM, C. L., PROKSCH, S. F., MARSH, A. M., MCWILLIAM, A. S. Regulation of dendritic cell recruitment into resting and inflamed airway epithelium: use of alternative chemokine receptors as a function of inducing stimulus. **Journal Immunology** 167: 228-234, 2001.

SMOAK, K. A., CIDLOWSKI, J. A. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. **Mechanisms of Ageing and Development** 125: 697-706, 2004.

TAKEDA, K., KAISHO, T., AKITA, S. Toll-like receptors. **Annual Review Immunology** 21: 335-376, 2001.

TAYLOR, P. M., WINNARD, J. G., JEFFERIES, R. LEES, P. Flunixin in the cat: a pharmacodynamic, pharmacokinetic and toxicological study. **British Veterinary Journal**. 150:253-262, 1994.

TITUS, R.G., CHILLER J., M. A Simple and effective method to assess murine delayed type hypersensitivity to proteins. **Journal of Immunological Methods**, 45: 63-78, 1981.

TRIEBOLD, H. O. Quantitative Analysis with Applications to Agricultural and food Products. **New York: Van Nostrand Company.**, p. 331, 1946.

ULFMAN, L.H., KUIJPER, P. H., van der LINDEN, J. A., LAMMERS, J. W., ZWAGINGA, J. J., KOENDERMAN, L. Characterization of eosinophil adhesion to TNF- $\alpha$ -activated under flow conditions:  $\alpha$ 4-integrins mediate initial attachment, and E-selectin mediates rolling. **Journal Immunology** 163: 343-3450, 1999.

VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W. J., BARRE, A., ROUGÉ, P. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences** 17: (6) 575 – 692, 1998.

VERDOLIN, B. A., FICKER, S. M., FARIA, A. M. C., VAZ, N. M., CARVALHO C. R. Stabilization of serum antibody responses triggered by initial mucosal contact with the antigen independently of oral tolerance induction. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 34:211-219, 2001.

VERMAELEN, K. Y., CARRO-MUINO, L., LAMBRECHT, B. N., PAUWELS, R. A. Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to thoracic lymph nodes. **Journal Experimental Medical** 193: 51-60, 2001.

WALLAYS, G. & CEUPPENS, J.L.- Human T lymphocytes activation by pokeweed mitogen induces production of TNF- $\alpha$  and GM-CSF and helper signaling by IL-1 and IL-6 results in IL-2 independent T cell growth. **European Cytokine Network**. 2:269-277, 1993.

WALSH, G.M., SEXTON,D.W., BLAYLOCK,M.G & CONVERY,C.M.- Resting and cytolytic-stimulated human small airway epithelial cells recognize and engulf apoptotic eosinophils. **Blood** 94(8): 2827-2835, 1999.

WALTER, M. J., KAJIWARA, N., KARANJA, P., CASTRO, M., HOLTZMAN, M. J. Interleukin 12 p 40 production by barrier epithelial cells during airway inflammation. **Journal Exploration Medical** 193: 339-351, 2001.

WANG, H., NG, T. B., OOI, V. E. C., LIU, W. K. Effects of lectins with different carbohydrate-binding specificities on hepatoma, choriocarcinoma, melanoma and osteosarcoma cells lines. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology** 32: 365 – 372, 2000.

WITCHEY-LAKSHMANAN, L. C..Long-action control of ectoparasites: a review of collar technologies for companion animals.Article.**Advanced Drug delivery Reviews**.38:113-122, 1999.

WOODLEY, J. Bioadhesion: new possibilities for drug administration? **Clinical Pharmacokinetics** 40: (2) 77 – 84, 2001.

YAMAZAKI, N., KOJIMA, S., BOVIN, N. V., ANDRÉ, S., GABIUS, S., GABIUS, H. J. Endogenous lectins as targets for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews** 43: 225 – 244, 2000.

YARMAC, E., ALKANAT, M. B., AKYLDIZ, M., IMZ, G., YILMAZ , R., ERHAN, Y. *Ulex europaeus* agglutinin (UEA-1) lectin binding in breast carcinoma and its relationship to

prognostic factors. **Annual Saudi Medicine** 16: 509 – 511, 1996.

YOON, T. J., YOO, Y. C., KANG, T. B., SHIMAZAKI, K. I., SONG, S. K., LEE, K. H., KIM, S. H., PARK, C. H., AZUMA, I., KIM, J. B. Lectins isolated from Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*) induces apoptosis in tumor cells. **Cancer Letters** 136: 33 – 40, 1999.

ZAMBENEDETTI, P., GIORDANO, R., ZATTA, P. Histochemical localization of glycoconjugates on microglial cells in Alzheimer's disease brain samples by using *Abrus precatorius*, *Maackia amaurensis*, *Momordica charantia* and *Sambucus nigra* lectins. **Experimental Neurology** 153(1):167-171, 1998.

ZANETTA, J. P., CEBO, C., VERGOTEN, G. Lectin activities of cytokines. A new concept in immunology. **Trends in Glycoscience and Glycotechnology** 14: 79, 2002.

ZINKERNAGEL, R. M. On differences between immunity and immunological memory. **Current Opinion Immunology** 10: 252-258, 2002.

ZINKERNAGEL, R. M. On natural and artificial vaccinations. **Annual Review Immunology** 21: 515-546, 2003.

## 8. ANEXOS

TABELA 1. Composição centesimal das sementes de *Talisia esculenta*.

Constituintes	Valores (%)
Umidade total	31,80
Matéria seca total	69,20
Proteína bruta	6,86
Extrato etéreo	0,20
Resíduo mineral	1,75
Carboidratos totais	60,39

TABELA 2. Imunogenicidade da lectina de *Talisia esculenta* (TEL) aplicada por via subcutânea em diferentes doses.

Tratamentos	Dia 0	Dia 07	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
TEL 50 $\mu$ g	23.8 $\pm$ 17.2Ac	1821.0 $\pm$ 570.0Aa	416.0 $\pm$ 172.0Bb	1556.6 $\pm$ 446.4Ba	1694.8 $\pm$ 378.5Ba	1158.4 $\pm$ 394.4Aa	1125.6 $\pm$ 160.2Ba
TEL 100 $\mu$ g	28.4 $\pm$ 19.3Ae	551.4 $\pm$ 74.7Bd	1691.0 $\pm$ 513.8Ac	4828.0 $\pm$ 629.5Aa	4169.6 $\pm$ 533.6Aab	3335.4 $\pm$ 1357.1Aabc	3101.0 $\pm$ 761.0Aabc
Ovalbumina	21.4 $\pm$ 17.5Ae	127.8 $\pm$ 34.7Cd	240.6 $\pm$ 35.3Cc	677.4 $\pm$ 136.7Cb	1488.2 $\pm$ 317.1Ba	229.2 $\pm$ 107.6Bc	212.0 $\pm$ 50.3Cc
Tampão fosfato*	9.8 $\pm$ 12.2Aa	27.0 $\pm$ 13.6Da	22.4 $\pm$ 12.5Da	12.0 $\pm$ 4.0Da	9.8 $\pm$ 8.3Ca	6.4 $\pm$ 3.5Cb	5.4 $\pm$ 3.0Db

\*PBS pH 7,4 0,1 M

Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre colunas (diferentes tratamentos dentro de cada dia)

por aplicação do teste t de Student aos escores determinados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre linhas (evolução da resposta a cada tratamento

ao longo dos dias) por aplicação do teste t de Student aos escores determinados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

TABELA 3. Efeito dos carboidratos ligantes sobre a imunogenicidade da lectina de *Talisia esculenta* (TEL) aplicada por via subcutânea.

Tratamentos	Dia 0	Dia 07	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
TEL 100 $\mu$ g	28.4 $\pm$ 19.3Ae	551.4 $\pm$ 74.7Ad	1691.0 $\pm$ 513.8Aa	4828.0 $\pm$ 629.5Aa	4169.6 $\pm$ 533.6Aab	3335.4 $\pm$ 1357.1Aabc	3101.0 $\pm$ 761.0Aabc
TEL GM <sup>(1)</sup>	0.0 $\pm$ 11.9Bd	30.2 $\pm$ 12.1Bc	58.0 $\pm$ 45.5Bc	219.9 $\pm$ 61.4Ba	249.0 $\pm$ 93.1Ba	162.8 $\pm$ 97.1Bb	216.2 $\pm$ 88.0Bab
TEL NAc <sup>(2)</sup>	3.6 $\pm$ 14.1Bc	3.2 $\pm$ 18.5Cc	2.6 $\pm$ 11.8Cc	0.0 $\pm$ 12.2Cc	1.7 $\pm$ 5.0Cc	91.6 $\pm$ 7.4Bb	163.4 $\pm$ 22.6Ba

(1) glucose-manose (2) N-acetil-D-glucosamina

Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre colunas (diferentes tratamentos dentro de cada dia) por aplicação do teste t de Student aos escores determinados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre linhas (evolução da resposta a cada tratamento ao longo dos dias) por aplicação do teste t de Student aos escores determinados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.



TABELA 4. Ação adjuvante da lectina de *Talisia esculenta* (TEL) aplicada por via subcutânea em diferentes doses.

Tramentos	Dia 0	Dia 07	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
TEL 50 $\mu$ g + OVA <sup>(1)</sup>	94.8 $\pm$ 11.7Ac	470.0 $\pm$ 112.7Ab	818.6 $\pm$ 154.0Aab	1302.4 $\pm$ 833.6Aa	1020.8 $\pm$ 643.2Bab	556.6 $\pm$ 352.5Ab	980.0 $\pm$ 644.5Aab
TEL 100 $\mu$ g + OVA	70.8 $\pm$ 7.9Ac	171.6 $\pm$ 57.2Bb	222.6 $\pm$ 112.4BCb	300.2 $\pm$ 223.1Cab	439.2 $\pm$ 302.8Ca	206.4 $\pm$ 99.6Bb	204.2 $\pm$ 56.4Bb
Ovalbumina (OVA)	21.4 $\pm$ 17.5Be	127.8 $\pm$ 34.7Bd	240.6 $\pm$ 35.3Bc	677.4 $\pm$ 136.7ABb	1488.2 $\pm$ 317.1ABa	229.2 $\pm$ 107.6Bc	212.0 $\pm$ 50.3Bc
OVA + Al(OH) <sub>3</sub> <sup>(2)</sup>	80.2 $\pm$ 5.6Af	292.4 $\pm$ 62.3Ad	130.6 $\pm$ 23.7Ce	439.2 $\pm$ 67.7Bcd	2439.0 $\pm$ 354.5Aa	820.6 $\pm$ 166.3Abc	844.2 $\pm$ 208.9Ab

(1) ovalbumina (2) hidróxido de alumínio

Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre colunas (comparação dos diferentes tratamentos dentro de cada dia) por aplicação do teste t de Student aos escores determinados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre linhas (evolução da resposta a cada tratamento ao longo dos dias) por aplicação do teste t de Student aos escores determinados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

TABELA 5. Imunogenicidade da lectina de *Talisia esculenta* (TEL) aplicada por via intranasal.

Tratamentos	Dia 0	Dia 07	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
TEL 10 $\mu$ g	27.6 $\pm$ 18.5Bd	76.2 $\pm$ 50.7Ac	37.8 $\pm$ 24.5Bcd	254.2 $\pm$ 155.8Ab	569.4 $\pm$ 85.5Ba	783.8 $\pm$ 837.2Ba	305.0 $\pm$ 76.9Bab
Ovalbumina	69.4 $\pm$ 27.5Bd	83.2 $\pm$ 53.9Ad	152.8 $\pm$ 50.5Ac	298.4 $\pm$ 184.4Ab	2123.6 $\pm$ 847.1Aa	2285.0 $\pm$ 895.7Aa	3023.6 $\pm$ 1085.0Aa
Tampão fosfato*	9.8 $\pm$ 12.2Aab	27.0 $\pm$ 13.6Ba	22.4 $\pm$ 12.5Bab	12.0 $\pm$ 4.0Cab	9.8 $\pm$ 8.3Cab	6.4 $\pm$ 3.5Cb	5.4 $\pm$ 3.0Cb

\*PBS pH 7,4 0,1 M

Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre colunas (diferentes tratamentos dentro de cada dia) por aplicação do teste t de Student aos escores determinados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre linhas (evolução da resposta a cada tratamento ao longo dos dias) por aplicação do teste t de Student aos escores determinados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

TABELA 6. Efeito dos carboidratos ligantes sobre a imunogenicidade da lectina de *Talisia esculenta* (TEL) aplicada por via intranasal.

Tratamentos	Dia 0	Dia 07	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
TEL 100 $\mu$ g	27.6 $\pm$ 18.5Ad	76.2 $\pm$ 50.7Ac	37.8 $\pm$ 24.5Acd	254.2 $\pm$ 155.8Ab	569.4 $\pm$ 85.5Aa	783.8 $\pm$ 837.2Aa	305.0 $\pm$ 76.9Aab
TEL GM	11.8 $\pm$ 26.7Ab	0.0 $\pm$ 12.1Bc	0.0 $\pm$ 10.7Bc	0.0 $\pm$ 46.2Cc	0.0 $\pm$ 111.9Cbc	0.0 $\pm$ 122.4Cbc	82.2 $\pm$ 61.2Ba
TEL NAc	21.6 $\pm$ 13.9Ac	63.2 $\pm$ 19.6Aab	34.6 $\pm$ 7.8Abc	80.2 $\pm$ 23.5Ba	56.2 $\pm$ 13.4Bab	66.6 $\pm$ 22.0Ba	85.4 $\pm$ 19.2Ba

(1) glucose-manose (2) N-acetil-D0-glucosamina

Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre colunas (diferentes tratamentos dentro de cada dia) por aplicação do teste t de Student aos escores determinados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre linhas (evolução da resposta a cada tratamento ao longo dos dias) por aplicação do teste t de Student aos escores determinados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

TABELA 7. Ação adjuvante da lectina de *Talisia esculenta* (TEL) aplicada por via intranasal.

Tramentos	Dia 0	Dia 07	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
Ovalbumina	69.4±27.5Ad	83.2±53.9Ad	152.8±50.5Ac	298.4±184.4Ab	2123.6±847.1Aa	2285.0± 895.7Aa	3023.6±1085.0Aa
TEL + OVA <sup>(1)</sup>	28.4±22.7Be	41.4±18.7Be	1.4±39.9Be	113.2± 50.8Bd	495.2±123.6Bc	1716.2±1138.3Ab	3142.4± 686.0Aa

(1) Ovalbumina

Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre colunas (comparação dos diferentes tratamentos dentro de cada dia) por aplicação do teste t de Student aos escores determinados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre linhas (evolução da resposta a cada tratamento ao longo dos dias) por aplicação do teste t de Student aos escores determinados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

TABELA 8. Efeito da lectina de *Talisia esculenta* (TEL), pura e pré-tratada com carboidratos específicos, sobre parâmetros biológicos do carrapato de bovinos *Boophilus microplus*.

Tratamentos	Peso da massa total de ovos postos (PMOT)	Perda de peso da quenógena (PQ)	Índice de eficiência reprodutiva (IER)	Índice de eficiência nutricional (IEN)
TEL 400mg/mL	80,40 ± 39,38 B	172,49 ± 40,94 B	34,88 ± 18,44 B	44,84 ± 17,88 B
TEL+GM <sup>(1)</sup>	111,91 ± 23,19 A	206,31 ± 26,11 A	44,96 ± 11,21 AB	54,57 ± 11,47 AB
TEL+NAC <sup>(2)</sup>	105,26 ± 28,53 A	177,19 ± 31,92 AB	47,71 ± 13,05 AB	58,46 ± 9,00 AB
Tampão fosfato *	129,09 ± 44,28 A	206,05 ± 41,53 A	49,89 ± 12,40 A	61,36 ± 10,32 A

(1) glucose-manose (2) N-Acetil-D-glucosamina

\*PBS pH 7,4 0,1 M

Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre linhas (comparação entre os diferentes tratamentos para cada parâmetro biológico estudado) por aplicação do teste t de Student aos escores determinados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.