

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA VEGETAL

“Efeitos Imunogênico, Adjuvante e Antifúngico da Lectina  
de Sementes de *Lablab purpureus* (L) SWEET e Efeito  
Antifúngico da Lectina de Sementes de *Talisia esculenta*  
(ST.HIL) RADLK”

Adriana de Queiroz Pinheiro

FORTALEZA - CE  
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA VEGETAL

“Efeitos Imunogênico, Adjuvante e Antifúngico da Lectina de Sementes de *Lablab purpureus* (L) SWEET e Efeito Antifúngico da Lectina de Sementes de *Talisia esculenta* (ST.HIL) RADLK”

*Adriana de Queiroz Pinheiro*

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica Vegetal, do Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração: Bioquímica Vegetal.

FORTALEZA - CE  
2005

"Efeitos Imunogênico, Adjuvante e Antifúngico da Lectina  
Sementes de *Lablab purpureus* (L) SWEET e Efeito Antifúngico  
da Lectina de Sementes *Talisia esculenta* (ST.HIL) RADLK"

P718e

Pinheiro, Adriana de Queiroz

Efeitos imunológico, adjuvante e antifúngico da lectina de *Lablab purpureus* (L.) Sweet e efeito antifúngico da lectina de sementes de *Talisia esculenta* / Adriana de Queiroz Pinheiro.

134 f.: il., enc.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

Orientador: Profa. Dra. Dirce Maria Fernandes Melo

Área de concentração: Bioquímica Vegetal

1 Lectinas 2. *Microsporium canis* I. Melo, Dirce Maria Fernandes II. Universidade Federal do Ceará, Pós-graduação em Bioquímica III. Título

CDD 574.192

CDU 631.576:54



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 em conformidade com as normas de ética científica.

Adriana de Queiroz Pinheiro

Tese aprovada em : \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Dirce Fernandes Melo  
Orientadora  
Universidade Federal do Ceará

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Maria da Guia Silva Lima  
Conselheira  
Universidade Federal do Ceará

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Diana Célia Nunes Pinheiro  
Conselheira  
Universidade Estadual do Ceará

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha  
Conselheiro  
Universidade Estadual do Ceará

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Deijanira Alves de Albuquerque  
Conselheira  
Universidade Federal do Mato Grosso

---

Profa Dra Dirce Maria Fernandes Melo  
Orientadora



*Com amor, à Arnobio, às minhas filhas  
queridas Joana e Luciana e aos meus  
queridos pais, Arnaldo e Carmélia com  
minha eterna gratidão.*

## AGRADECIMENTOS

- À Professora Dra Maria da Guia Silva Lima (UFC) pelo incentivo, pelo crédito de confiança e exemplo de compromisso e boa vontade.
- À Professora Dra. Dirce Maria Fernandes Melo (UFC) por ter me acolhido com tanto carinho, pela confiança e apoio na conclusão desse trabalho.
- À Professora Dra. Diana Célia Nunes Pinheiro (UECE) pela orientação e participação na execução desse trabalho e ainda pela sua generosa contribuição com os meios de cultura para fungos.
- À Professora Dra. Maria Lígia R. Macedo (UNICAMP) pela purificação da lectina *Lablab purpureus* e pela concessão da lectina de *Talisia esculenta*.
- Aos Professores. Dr. José Júlio Costa Sidrim (UFC) e Dr Marcos Fábio Gadelha Rocha (UECE) pelo acesso ao seu laboratório e estudantes e pelas cepas fúngicas cedidas.
- Ao Prof. Dr. Claudio Campello . pela análise estatística desse trabalho.
- Ao Prof. Dr. Benildo Cavada. Além do exemplo de dinamismo e trabalho, agradeço-lhe pela generosidade em ceder seu laboratório e estudantes para marcação com FITC das lectinas utilizadas nesse trabalho.
- Ao Prof. Dr. Renato Moreira pelos valiosos ensinamentos sobre as técnicas de purificação de lectinas e pelo livre acesso ao seu laboratório.
- À toda equipe do Prof. Renato.
- À colega e amiga Verônica pelo seu apoio e companhia ao longo do curso.
- Aos Colegas do laboratório 2065 (Departamento de Bioquímica-UFC), especialmente, Daniel e Ana Claudia pela ajuda nos ensaios laboratoriais.
- Aos estudantes de Veterinária da UECE, Débora, Clarisse e Camila pela ajuda nos experimentos.
- Aos Colegas Vitor, Edson, Carlos e Tatiana do Biomol (Departamento de Bioquímica-UFC), pela contribuição nos ensaios com lectina marcada.
- Aos eternos amigos Júlio, Bosco, Marcos e Nilzinha, os grandes responsáveis pela minha introdução na carreira acadêmica

- À Universidade Federal do Ceará através de seu Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Vegetal e de seu Departamento de Bioquímica, pelos seus Professores e Funcionários.
- À Universidade Estadual do Ceará, especialmente à Coordenação de Medicina Veterinária pela liberação para cursar o Doutorado e por todo o apoio e compreensão nessa etapa final.
- À FUNCAP pelo suporte financeiro.

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b>	Modelo da arquitetura da parede celular de <i>Candida albicans</i> ..	25
<b>Figura 2.</b>	Ensaio de inibição de crescimento fúngico em placa de microdiluição.....	45
<b>Figura 3.</b>	Sementes e vagens de <i>Lablab purpureus</i> .....	50
<b>Figura 4.</b>	Cromatografia de afinidade em coluna de ovalbumina-Sepharose 4B (1,0x17 cm, vol. 15mL) de lectina de sementes de <i>Lablab purpureus</i> . ....	51
<b>Figura 5.</b>	Eletroforese de LLP em gel de poliacrilamida 12,5% com SDS. ....	52
<b>Figura 6.</b>	Cinética da síntese de anticorpos específicos, determinados por ELISA, em camundongos imunizados com diferentes doses de LLP: 50 e 100 µg/animal. ....	55
<b>Figura 7.</b>	Cinética da síntese de anticorpos específicos, determinada por ELISA, em camundongos imunizados por via subcutânea com LLP pura ou conjugada a diferentes carboidratos. ....	57
<b>Figura 8.</b>	Padrão isotípico de anticorpos específicos, determinado por ELISA, produzido na resposta secundária (28 dias) à imunização subcutânea com solução contendo 50 µg de LLP pura e conjugada a diferentes carboidratos (0,1M). ....	60



- Figura 9.** Síntese de anticorpos específicos para LLP na resposta secundária (28 dias), determinado por ELISA em placa sensibilizada com solução de LLP (0,4 µg/poço) pura e conjugada a diferentes carboidratos; (A) D-glucose/ D-manose; (B) N-acetil- D-glucosamina. .... 61
- Figura 10.** Cinética da síntese de anticorpos específicos, determinados por ELISA, em camundongos imunizados por via subcutânea com 10 µg de ovalbumina pura ou associada a diferentes doses de LLP: 50 e 100 µg/animal..... 64
- Figura 11.** Cinética da síntese de anticorpos específicos, determinados por ELISA, em grupos de camundongos imunizados por via subcutânea com 10 µg de ovalbumina pura, ou associada à LLP ou ao Al(OH)<sub>3</sub>. .... 66
- Figura 12.** Cinética da síntese de anticorpos específicos, determinados por ELISA, em grupos de camundongos imunizados por via subcutânea com 10 µg de ovalbumina pura ou associada a solução contendo 50 µg de LLP pura ou conjugada a diferentes carboidratos (0,1M). .... 68
- Figura 13.** Padrão isotípico de anticorpos específicos, determinado por ELISA, produzido na resposta secundária (28 dias) à imunização subcutânea com ovalbumina pura ou associada ao Al(OH)<sub>3</sub> ou à 50 µg de LLP . .... 71
- Figura 14.** Cinética da síntese de IgE, em camundongos imunizados por via subcutânea: (A) com ovalbumina pura ou associada ao Al(OH)<sub>3</sub> ou a LLP; (B) com ovalbumina pura e associada a

LLP pura ou conjugada a diferentes carboidratos (0,1M).....	73
<b>Figura 15.</b> Evolução do crescimento de <i>M. canis</i> em RPMI após incubação prévia com lectina de <i>Talisia esculenta</i> (TEL), extrato total (ET) e lectina de <i>L. purpureus</i> (LLP), utilizados na concentração de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ .....	77
<b>Figura 16.</b> Evolução do crescimento de <i>M. canis</i> em RPMI após incubação prévia com lectina de <i>Talisia esculenta</i> (TEL), extrato total (ET) e lectina de <i>L. purpureus</i> (LLP), utilizados na concentração de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ . .....	79
<b>Figura 17.</b> Evolução do crescimento de <i>M. canis</i> em RPMI após incubação prévia com lectina de <i>Talisia esculenta</i> (TEL), extrato total (ET) e lectina de <i>L. purpureus</i> (LLP) Efeito comparativo entre ET, LLP e TEL, utilizados na concentração de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ .. .....	81
<b>Figura 18.</b> Evolução do crescimento de <i>M. canis</i> em RPMI após incubação prévia com lectina de <i>L. purpureus</i> (LLP) conjugada aos carboidratos D-glucose, D-manose e N-acetil-D-glucosamina. ....	84
<b>Figura 19.</b> Evolução do crescimento de <i>M. canis</i> após incubação prévia de pêlos artrosporados com a lectina (LLP) e extrato total (ET)	86
<b>Figura 20</b> Efeito de LLP e TEL conjugadas a FITC sobre leveduras do gênero <i>Candida</i> .....	89
<b>Figura 21</b> Efeito de LLP e TEL conjugadas a FITC sobre artrosporos de	



*M. canis* presentes em pêlos de animais infectados..... 90

**Figura 22** Efeito de LLP e TEL conjugadas a FITC sobre macroconídios obtidos de *M. canis* ..... 91

## LISTA DE TABELAS

---

TABELA 1.	Diferentes polissacarídeos observados na parede fúngica.....	23
TABELA 2.	Composição centesimal de sementes maduras de <i>Lablab purpureus</i> . .....	49
TABELA 3.	Inibição da atividade hemaglutinante do extrato total e da fração purificada da lectina de <i>Lablab purpureus</i> .....	53
TABELA 4.	Cinética da síntese de anticorpos específicos produzidos por camundongos inoculados com diferentes doses da lectina de <i>Lablab purpureus</i> .....	56
TABELA 5.	Cinética da síntese de anticorpos específicos produzidos por camundongos inoculados com solução de LLP pura ou conjugada a cada monossacarídeos: N-acetil- D-glucosamina, D- glucose e D- manose.....	58
TABELA 6.	Padrão isotípico da síntese de imunoglobulinas anti-LLP na resposta secundária (28 dias).....	62
TABELA 7.	Síntese de anticorpos específicos para LLP na resposta secundária (28 dias), determinado por ELISA em placa sensibilizada com solução de LLP (0,4 µg/poço) pura e conjugada a diferentes carboidratos; (A) D-glucose/ D-manose; (B) N-acetil- D-glucosamina.....	62
TABELA 8.	Cinética da síntese de anticorpos específicos para OVA	

	produzidos por camundongos inoculados com OVA pura e associada à diferentes doses de LLP: 50 e 100µg.....	65
<b>TABELA 9.</b>	Cinética da síntese de anticorpos específicos produzidos por camundongos inoculados com solução de OVA pura ou conjugada à LLP ou ao Al(OH) <sub>3</sub> .....	67
<b>TABELA 10.</b>	Cinética da síntese de anticorpos específicos produzidos por camundongos inoculados com o conjugado LLP-OVA, pura ou associada aos monossacarídeos N-acetil- D- glucosamina, D- e glucose/ D- manose.....	69
<b>TABELA 11.</b>	Padrão isotópico da síntese de imunoglobulinas anti-OVA na resposta secundária (28 dias).....	72
<b>TABELA 12</b>	Cinética da síntese de IgE específica, determinada pela técnica de PCA, produzidos por camundongos inoculados com ovalbumina pura e associada a lectina de <i>Lablab purpureus</i> ou ao Al(OH) <sub>3</sub> .....	74
<b>TABELA 13</b>	Cinética da síntese de IgE específica, determinada pela técnica de PCA, produzidos por camundongos inoculados com ovalbumina associada a LLP pura ou conjugada aos carboidratos D-glucose/ D-manose (GM) e N-acetil-D- glucosamina (GlcNac).....	74

<b>TABELA 14</b>	Concentração inibitória mínima dos tratamentos utilizados no ensaio antifúngico de microdiluição em placa.....	75
<b>TABELA 15</b>	Evolução do crescimento de <i>Microsporum canis</i> em RPMI induzida por tratamento com TEL e com o extrato total e lectina de <i>Lablab purpureus</i> na concentração de 1000µg/mL <sup>-1</sup> ..	78
<b>TABELA 16</b>	Evolução do crescimento de <i>Microsporum canis</i> em RPMI induzida por tratamento com TEL ou com o extrato total e lectina de <i>Lablab purpureus</i> na concentração de 250µg/mL <sup>-1</sup> ..	80
<b>TABELA 17</b>	Evolução do crescimento de <i>Microsporum canis</i> em RPMI induzida por tratamento com TEL, com extrato total ou com lectina de <i>Lablab purpureus</i> na concentração de 125µg/mL <sup>-1</sup> ..	82
<b>TABELA 18</b>	Evolução do crescimento de <i>Microsporum canis</i> em RPMI a partir do tratamento do inóculo com a lectina de <i>Lablab purpureus</i> (LLP) pura ou conjugada aos monossacarídeos N-acetil- D- glucosamina, D- glucose e D- manose.....	85
<b>TABELA 19</b>	Evolução do crescimento de <i>Microsporum canis</i> em ágar Sabouraud a partir do tratamento de pêlos contendo artrosporos com a lectina de <i>Lablab purpureus</i> (LLP) e com o extrato total de sementes de <i>Lablab purpureus</i> (ET).....	87

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

APC	Célula apresentadora de antígenos
CD	<b><i>Cluster of differentiation</i></b>
C5a, C3a	Terceiro e quinto fator do sistema complemento
ConA	Concanavalina A- lectina de <i>Canavalia ensiformes</i>
ConBr	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
IL	Interleucinas
IgA, IgE, IgM, IgG	Imunoglobulinas das classes A, E, M e G
GlyCAM	Molécula de adesão glicosilada
Gal	Galactose
GlcNac	N-acetilglucosamina
Glu	Glucose
LLP	Lectina de <i>Lablab purpureus</i>
MBL	Lectina ligantes de manose
Man	Manose
MOPS	Ácido morfolino- propanesulfônico
OVA	Ovalbumina
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
PAMPS	Padrões moleculares associados a patógenos
PHA	Lectina de sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PG	Prostaglandinas
RPMI	Meio de cultura de células também usado para testes de inibição de crescimento fúngico
TLR	<i>Toll like</i> receptores
TEL	Lectina de <i>Talisia esculenta</i>
PCA	Anafilaxia passiva cutânea



UDA	Aglutinina de <i>Urtiga dioica</i>
VCAM	Molécula de adesão vascular
WGA	Aglutinina de germe de trigo
APC	Célula apresentadora de antígenos
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
C5a, C3a	Terceiro e quinto fator do sistema complemento
ConA	Concanavalina A- lectina de <i>Canavalia ensiformes</i>
ConBr	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
IL	Interleucinas
IgA, IgE, IgM, IgG	Imunoglobulinas das classes A, E, M e G
GlyCAM	Molécula de adesão glicosilada-
Gal	Galactose
GlcNac	N-acetilglucosamina
Glu	Glucose
LLP	Lectina de <i>Lablab purpureus</i>
MBL	Lectina ligantes de manose
MIP	Proteína inflamatória de macrófagos
Man	Manose
MOPS	Ácido morfolino- propanesulfônico
OVA	Ovalbumina
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
PAMPS	Padrões moleculares associados a patógenos
PHA	Lectina de sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PG	Prostaglandinas

PECAM	Molécula de adesão de célula endotelial e plaqueta
RPMI	Meio de cultura de células também usado para testes de inibição de crescimento fúngico
TLR	<i>Tool like</i> receptores
TEL	Lectina de <i>Talisia esculenta</i>
PCA	Anafilaxia passiva cutânea
UDA	Aglutinina de <i>Urtiga dioica</i>
VCAM	Molécula de adesão vascular
WGA	Aglutinina de germe de trigo

## RESUMO

---

Esse trabalho foi desenvolvido com o objetivo de investigar os efeitos biológicos da lectina extraída das sementes de *lablab purpureus* (L.) Sweet (LLP) incluindo suas atividades imunogênicas e adjuvantes sobre a resposta imune humoral de camundongos e sua ação sobre o crescimento dos fungos patogênicos *Microsporium canis* e *Candida sp.* comparando esses efeitos com a lectina fungicida obtida de sementes de *Talisia esculenta* (TEL). A resposta imune foi avaliada através de ELISA. LLP mostrou ser imunogênica com efeito dose-dependente, induzindo a produção de níveis altos de anticorpos específicos após inoculação subcutânea. O padrão isotípico de imunoglobulinas anti-LLP foi caracterizado pela predominância de IgG. A aplicação de LLP conjugada a ovalbumina potencializou a produção de anticorpos contra esta proteína, sendo esse efeito expressivo quando comparado ao uso de  $Al(OH)_3$ , revelando que LLP apresenta ação adjuvante. O extrato protéico total (ET) e a lectina purificada (LLP) de sementes de *L. purpureum* não foram hábeis em inibir o crescimento das espécies de leveduras estudadas. Os cálculos das concentrações inibitórias mínimas para ET e LLP alcançaram 250 e 1000  $\mu g.mL^{-1}$ , respectivamente, sobre as 20 cepas de *M. canis* estudadas. Ainda assim, a adição dos carboidratos D-glucose, D-manose e, especialmente, GlcNAc inibiram esse efeito antifúngico. No entanto, ET e LLP foram hábeis em inibir o crescimento de formas artrosporadas ricas em quitina de *M. canis* presentes em pêlos de animais infectados e inoculados em Ágar Saboraud. Ao contrário de TEL, LLP conjugada a FITC não marcou macroconídios e artrosporos de *M. canis*, conforme pôde ser observado através de microscopia de fluorescência. Esses resultados sugerem que os efeitos de LLP sobre o crescimento de *M. canis* podem ser entendidos como consequência da interação lectina-carboidrato presente na superfície do microrganismo, principalmente GlcNAc.



## ABSTRAT

---

This work was carried out with the overall aim of to investigate biological features of the lectin obtained from *Lablab purpureum* seeds (LLP) regarding to its immunogenic and adjuvant activities over humoral immune response in mice and its action on the growth of fungi *Microsporium canis* and *Candida sp.* compared to the effects of a fungistatic lectin obtained from *Talisia esculenta* seeds (TEL). Immune response was evaluated through ELISA. LLP showed to be immunogenic in a dose-dependent way, triggering off the production of specific antibodies in high levels after subcutaneous injection. It was also observed that anti-LLP antibodies profile was characterized by predominance of IgG class. Application of LLP conjugated to ovalbumin increased antibody production against this protein, being this effect more pronounced than that verified with the use of Al (OH)<sub>3</sub>, revealing that LLP possess expressive adjuvant action. The crude extracts (CE) obtained from *L. purpureum* seeds and the purified LLP were not able to inhibit significantly the growing of studied yeasts. Minimum inhibitory concentrations (MIC) calculated for CE and LLP achieved 250 and 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectively, over 20 samples of *M. canis* tested. Even so, addition of carbohydrates D-glucose, D-manose and specially GlcNAc inhibited these antifungal effects. On the other hand, CE and LLP were able to inhibit the growth of artrosporated chitin-rich forms of *M. canis* obtained from infected animal hair and cultured in Agar Saboraud. FITC-conjugated TEL, but not LLP, was able to link macroconidia and arthosporated forms of *M. canis*, as it was shown by fluorescent microscopy. These results suggested that inhibitory effects of LLP on *M. canis* growth may be related to lectin interaction with carbohydrates present in microorganism surface, mainly GlcNAc.

## SUMÁRIO

---

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE TABELAS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMO.....	XI
ABSTRACT.....	XII
1 INTRODUÇÃO.....	
1.1 Generalidades.....	1
1.1.1 Lectinas.....	1
1.1.2. Considerações Gerais sobre Lectinas de Leguminosas.....	4
1.1.3 Especificidades de Lectinas Vegetais por Carboidratos.....	5
1.2 Lectinas de <i>Lablab purpureus</i> .....	6
1.3 Aspectos Gerais dos Mecanismos da Resposta Imune Inata e Adquirida.....	9
1.3.1 Mecanismos de Imunoestimulação e Ação Adjuvante.....	11
1.3.2 Considerações sobre a Utilização de Lectinas Vegetais como Ferramenta Moduladora da Resposta Imunológica .....	14
1.4 Aspectos Gerais de Fungos de Interesse Médico.....	19
1.4.1 <i>Microsporum canis</i> .....	19
1.4.2 <i>Candida sp.</i> .....	21
1.4.3 Parede Celular de Fungos.....	22
1.4.5 Considerações sobre a Utilização de Lectinas Vegetais em Micologia.....	26
2 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVO.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	
3.1 Amostras vegetais.....	33
3.2 Animais.....	33
3.3 Amostras Microbianas.....	33
3.4 Análise Elementar da Farinha de <i>L. purpureus</i> .....	34

3.4.1	Determinação do teor de umidade.....	34
3.4.2	Determinação do Teor de Lipídios.....	34
3.4.3	Determinação das Cinzas.....	35
3.4.4	Determinação da Proteína Total.....	35
3.4.5	Determinação da Fibra Bruta de Carboidratos.....	36
3.5	Determinação Atividade Hemaglutinante.....	36
3.6	Dosagem de Proteínas Solúveis.....	37
3.7	Obtenção da Lectina de sementes de <i>Lablab purpureus</i> (LLP)	
3.7.1	Preparação da Farinha.....	38
3.7.2	Preparação do Extrato Total.....	38
3.7.3	Preparação da Fração Precipitada com Sulfato de Amônio.....	38
3.7.4	Cromatografia de Afinidade.....	39
3.8	Eletroforese da Lectina de <i>Lablab purpureus</i> .....	39
3.9	Ensaio Biológicos .....	40
3.9.1	Atividades Imunogênica e Adjuvante da Lectina de <i>Lablab purpureus</i> (LLP)	
3.9.1.1	Protocolo de Imunização.....	40
3.9.1.2	Avaliação do Efeito Adjuvante e Antigênico na Síntese de Imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA) Determinadas por ELISA.....	41
3.9.1.3	Avaliação do Efeito Adjuvante na Síntese de IgE Determinada por PCA.....	42
3.9.2	Avaliação da Atividade Marcadora e Inibitória de LLP sobre <i>Microsporium canis</i> e <i>Candida sp</i> .....	43
3.9.2.1	Ensaio de Inibição do Crescimento Fúngico pelo Método de Microdiluição em caldo.....	43
3.9.2.1.1	<i>Microsporium canis</i> .....	43
3.9.2.1.2	<i>Candida sp</i> .....	46
3.9.2.2	Ensaio de Inibição do Crescimento do <i>Microsporium canis</i> à partir de Pêlos Obtidos de Cães e Gatos Portadores de Dermatofitose.....	46
3.9.2.3	Marcação de Lectinas com Isotiocianato-5 -Fluoresceína (FITC)....	47
3.9.2.3	Análise do Efeito da Lectina-FITC sobre Dermatófitos e Leveduras.....	47

3.10	Análise Estatística.....	48
4	RESULTADOS	
4.1	Análise Elementar da Farinha de <i>Lablab purpureus</i> .....	49
4.2	Cromatografia de Afinidade e Eletroforese da Lectina de <i>Lablab purpureus</i> ...	51
4.3	Eletroforese da lectina de <i>Lablab purpureus</i> (L) Sweet (LLP).....	52
4.4	Inibição da Atividade Hemaglutinante.....	53
4.5	Ensaio Biológicos.....	54
4.5.1	Atividades Imunogênica, Adjuvante e Inflamatória de Lectina de <i>Lablab purpureus</i> .....	54
4.5.1.1	Avaliação do Efeito Imunogênico de LLP.....	54
4.5.1.1.1	Síntese de Imunoglobulinas Específicos Induzidos por Diferentes Doses de LLP.....	54
4.5.1.1.2	Síntese de Anticorpos Específicos Induzidos por LLP Conjugada aos Carboidratos D-glucose/ D-manose e N-acetil- D-glucosamina.....	54
4.5.1.1.3	Padrão Isotípico da Resposta Secundária de 28 dias Induzida por LLP Conjugada aos Carboidratos D-manose/ D-Glucose e N-acetil-D-glucosamina.....	59
4.5.1.1.4	Detecção de Anticorpos Específicos para LLP na Resposta Secundária (28 dias) Através da Sensibilização da Placa para ELISA com LLP conjugada aos Carboidratos D-manose/ D-Glucose e N-acetil-D-glucosamina .....	59
4.5.1.2	Avaliação do Efeito Adjuvante de LLP.....	63
4.5.1.2.1	Síntese de Imunoglobulinas Anti-Ovalbumina (OVA) em Presença de LLP e Al(OH) <sub>3</sub> .....	63
4.5.1.2.2	Síntese de Anticorpos Anti-OVA Induzida por LLP Conjugada aos Carboidratos D-glucose/ D-manose e N-acetil- D-glucosamina.....	63
4.5.1.1.1	Padrão Isotípico de Imunoglobulinas Anti-OVA Produzidas na Resposta Secundária (28 dias) em Presença de Al(OH) <sub>3</sub> e de LLP pura ou Conjugada aos Carboidratos D-manose/ D-Glucose e N-acetil-D-glucosamina.....	70



4.5.1.1.2	Síntese de IgE anti-Ovalbumina Induzida em presença de LLP e Al(OH) <sub>3</sub> .....	70
4.5.1.1.3	Síntese de IgE Específica para OVA Induzida em presença LLP Conjugada aos Açúcares D-manose/ D-Glucose e N-acetil-D-glucosamina .....	70
4.5.2	Avaliação dos Efeitos da lectina de <i>Lablab purpureus</i> e da lectina de <i>Talisia esculenta</i> sobre <i>M. canis</i> e <i>Candida sp</i> .....	75
4.5.2.1	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Lectina de <i>T. esculenta</i> (TEL) e do Extrato Total e Lectina de <i>L. purpureus</i> sobre o Crescimento de <i>M. canis</i> em RPMI.....	75
4.5.2.2	Evolução do Crescimento de <i>M. canis</i> Tratado com LLP, ET e TEL na concentração de 1000µg.mL <sup>-1</sup> .....	76
4.5.2.3	Evolução do Crescimento de <i>M. canis</i> Tratado com LLP, ET e TEL na concentração de 250 µg.mL <sup>-1</sup> .....	76
4.5.2.4	Evolução do Crescimento de <i>M. canis</i> Tratado com LLP, ET na concentração de 125µg/mL <sup>-1</sup> .....	76
4.5.2.5	Evolução do Crescimento de <i>M. canis</i> Tratado com LLP Associado a Carboidratos.....	83
4.5.2.6	Evolução do Crescimento de <i>M. canis</i> a partir do Tratamento de Artrosporos em Pêlos Infectados com ET e LLP na Concentração de 1000µg/mL <sup>-1</sup> .....	83
4.5.2.7	Análise Microscópica do Efeito de LLP e TEL Conjugadas a FITC sobre <i>M. canis</i> e Leveduras do Gênero <i>Candida</i> .....	88
5	DISCUSSÃO.....	92
6	CONCLUSÕES.....	104
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	106

# 1 INTRODUÇÃO

---

## 1.1 Lectinas

### 1.1.1 Generalidades

As lectinas por muito tempo foram conhecidas como aglutininas ou hemaglutininas. Tais denominações partiram de ELFSTRAND (1898), quando tentava descrever proteínas que aglutinavam hemácias. Por mais de 50 anos esses termos perduraram como denominação única, até que BOYD E SHAPLEIGH (1954), inspirados no latim, sugerissem o nome lectina (*legere* escolher), para tornar clara a capacidade dessas substâncias de reconhecerem especificamente grupos sanguíneos. No entanto, foram os trabalhos desenvolvidos por STILLMARK (1888-1889) que representaram o marco inicial da história das lectinas. Esse pesquisador, quando investigava os efeitos tóxicos de vegetais utilizados como medicamentos, demonstrou que a substância responsável pela hemaglutinação causada por extratos de mamona (*Ricinus communis*), era uma proteína que chamou ricina.

Posteriormente, os estudos pioneiros de STILLMARK, aliado ao avanço das técnicas de purificação e caracterização de lectinas, permitiram que evidências fossem acumuladas sobre a atuação dessas proteínas como mediadoras do reconhecimento celular em uma grande variedade de sistemas biológicos. Por conseguinte, a difundida ocorrência de lectinas na natureza, seu amplo estudo como proteínas ligantes de carboidratos e sua freqüente utilização em pesquisa biológica tornaram imprescindível uma reavaliação dos critérios necessários para considerar uma proteína como sendo desse grupo. Dessa forma, a evolução do conhecimento das lectinas foi pautada por várias tentativas de definições que sempre buscaram caracterizar de forma padronizada as propriedades físico-químicas e biológicas das mesmas.

A primeira definição operacional foi apresentada por GOLDSTEIN *et al.* (1980), que apontou as lectinas como “proteínas de origem não imune, ligantes de carboidratos, que aglutinam células e/ou precipitam conjugados”. Tal conceito foi inicialmente aceito pela Comissão de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica que, no entanto, recomendou a retirada do termo glicoproteínas (DIXON, 1981). Todavia, muitos lectinólogos consideraram que a capacidade de aglutinar células, isoladamente, não era suficiente para caracterizar esse grupo de proteínas, uma vez que outros agentes (p.ex., taninos, certos lipídios, íons divalentes em altas concentrações) também são capazes de produzir essa reação. Portanto, para garantir-se que a aglutinação está sendo mediada pela ação lectínica exige-se que ocorra a inibição desta atividade por carboidratos. Assim, a definição proposta por GOLDSTEIN *et al.* foi diversas vezes modificada.

Considerando características particulares que fogem à regra geral PEUMANS & VAN DAMME (1995) propuseram a mais recente definição, estabelecendo que “lectinas são proteínas de origem não-imune, que possuem, pelo menos, um sítio de ligação reversível a oligo ou monossacarídeo e que, no caso de possuírem atividade enzimática, esses sítios não são requeridos para atividade catalítica”. De fato, segundo opinião expressada por MOREIRA (1998), este foi o conceito mais adequado para lectinas, pois mesmo sem enfatizar a atividade hemaglutinante, inclui várias proteínas que se comportam diferentemente com relação às propriedades aglutinantes e/ou precipitantes de glicoconjugados.

PEUMANS & VAN DAMME (1995) também agruparam as lectinas conforme suas características estruturais e mecanismos de interação com carboidratos, sendo descritas as seguintes categorias: merolectinas, hololectinas e quimerolectinas. Merolectinas são proteínas que apresentam um único domínio de ligação a carboidratos e, portanto, incapazes de precipitar glicoconjugados ou aglutinar células. As hololectinas também apresentam um único domínio de ligação a carboidratos por molécula, mas contém dois ou mais cadeias polipeptídicas domínios ligantes que são idênticos ou bastante similares. Como são multivalentes aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados. A maioria das lectinas vegetais pertence ao subgrupo das hololectinas. As quimerolectinas:

são compostas de um ou mais domínios de ligação a carboidratos e um domínio não relacionado com o anterior. Este último pode apresentar atividade enzimática bem definida ou qualquer outra atividade biológica contanto que atue independentemente do(s) domínio(s) de ligação a carboidratos. Dependendo do número de sítios de ligação a carboidratos, as quimerolectinas comportam-se como merolectinas ou como hololectinas. Um representante deste grupo é a proteína inativadora de ribossomos (RIP tipo 2), como por exemplo a ricina (toxina de mamona), que possui dois domínios de ligação para carboidratos comportando-se como uma hololectina. O termo superlectinas foi acrescentado a essa classificação por VAN DAMME *et al.*(1998) para incluir as proteínas que apresentam pelo menos dois domínios de ligação para carboidratos independentes estrutural e funcionalmente. Como exemplo, pode ser citada a lectina de tulipa (TxLC-I) que consiste de um domínio de ligação para manose, seguido por um domínio não relacionado de ligação a N-acetilgalactosamina.

Quanto à ocorrência, as lectinas estão presentes nos mais diversos organismos, desde os mais simples aos mais complexos. Muitas delas já foram isoladas de vírus, bactérias, fungos, protozoários, plantas e animais: invertebrados e vertebrados (SINGH *et al.*, 1999).

A despeito da ampla distribuição das lectinas, é nos vegetais, destacando-se as plantas superiores, onde têm sido mais estudadas, não somente pela facilidade de seu isolamento, mas, sobretudo, pela importância econômica e nutricional das espécies vegetais em que são encontradas. Embora tenham sido observadas em diferentes tecidos, como folhas, raízes e casca, as lectinas são geralmente mais abundantes nas sementes e em outros órgãos de reserva, como tubérculos, bulbos, rizomas e cascas de plantas (SINGH *et al.*, 1999). A classe das Dicotiledôneas abrange o maior número de lectinas já isoladas e caracterizadas, sendo as sementes maduras, sobretudo da família das leguminosas, a mais rica fonte dessas proteínas, as quais representam 10% do total de proteínas solúveis desses órgãos.



### 1.1.2 Considerações Gerais Sobre Lectinas de leguminosas

Oferecendo uma das mais extraordinárias riquezas de biodiversidade do trópico latino-americano, a família *Leguminosae*, destaca-se como uma das principais fontes de moléculas biologicamente ativas, sobretudo de lectinas, as quais mais de 100 foram isoladas desses vegetais (SHARON & LIS, 1999).

As lectinas de leguminosas são muito semelhantes em suas propriedades físico-químicas e mostram alto grau de homologia na seqüência de aminoácidos, mas diferem quanto às suas especificidades glicídicas (CAVADA et al., 1998). Duas ou mais diferentes lectinas podem ser encontradas numa mesma semente, consistindo normalmente de 2 ou 4 subunidades (25-30kDa), cada uma dotada de um sítio de ligação para carboidrato.

A Concanavalina A (ConA), lectina extraída de *Canavalia ensiformis*, representa um exemplo de lectina destituída de carboidratos. Não sendo glicoproteína, difere de várias outras que, na maioria das vezes, apresentam cadeias dotadas de menor ou maior teor de glicosilação. Grande parte desse grupo de proteínas requer a presença de íons metálicos divalentes  $Mn^{+2}$  e  $Ca^{+2}$  para interagirem em sítios específicos da estrutura protéica e fixarem as posições dos aminoácidos que interagem com os açúcares, conferindo um alto grau de estabilidade estrutural e protegendo-as contra inativação pelo calor e da hidrólise por enzimas proteolíticas (SHARON & LIS, 1999; WEISS & DRICKAMER, 1996).

A formação de dímeros ou tetrâmeros, combinado à ocorrência ou não de glicosilação, implica na existência de diferentes formas moleculares para essas proteínas. A heterodimerização é comum nas lectinas de leguminosas, originando assim, estruturas tetraméricas com quatro sítios de ligação a carboidratos. Existem três razões para a heterogeneidade das lectinas: (1) processos pós-traducionais incompletos, o que acarreta diferenças nas extremidades C e N-terminal; (2) variações na glicosilação da proteína; (3) heterogeneidade genética, isto é, mais de um gene codificando a lectina (SHARON & LIS, 1989; VAN DAMME et al, 1990).

O papel fisiológico das lectinas de leguminosas ainda não foi totalmente elucidado, apesar de esta não ser uma particularidade somente de lectinas, uma vez que muitas outras macromoléculas vegetais biologicamente ativas ainda não têm sua atuação biológica totalmente estabelecida. No entanto, nos últimos anos, glicobiologistas propuseram algumas funções para as lectinas, abordando dois conceitos gerais: o papel extrínseco e o intrínseco (RUDIGER, 1998). No primeiro caso, incluem-se lectinas que atuam como proteínas de defesa fazendo interações com parasitas de vegetais e exercendo efeito inibitório sobre o crescimento fúngico e bacteriano (VAN PARIJS *et al.*, 1991; NIEVA MORENO *et al.*, 1997). Já a função intrínseca é atribuída àquelas lectinas que se apresentam como proteínas de reserva, em face da degradação das mesmas durante a germinação de sementes para produção de energia (ROSÉN *et al.*, 1997), ou da interação com enzimas, como as glicosidases, modulando sua ação intracelular (GRANT;1999)

### **1.1.3 Especificidade de Lectinas Vegetais por Carboidratos**

A especificidade por carboidratos, requisito essencial para que uma proteína seja definida lectina, constitui importante critério para classificar essas proteínas que, segundo sua afinidade por açúcares simples foram inicialmente classificadas por MAKELA (1957) em quatro grupos, dependendo da configuração relativa de C3 e C4 do anel piranosídico: grupo I (L-fucose), grupo II (galactose, acetilgalactosamina), grupo III (glucose, manose) e grupo IV (D-idose, L-glucose e L-xilose). Decorridas quase cinco décadas dessa classificação, nenhuma lectina isolada foi inibida por açúcares pertencentes ao grupo IV. Por outro lado, algumas dessas proteínas apresentaram-se fortemente inibidas pelos açúcares N-acetil-D-glucosamina (GlcNac) e ácidos siálico. No intuito de incluí-los, PEUMANS E VAN DAMME (1998) apresentaram a mais recente de classificação na qual foi excluído o grupo IV de Makela e foram acrescentados três grupos: GlcNac; ácido siálico e glicanos complexos.

A afinidade das lectinas por monossacarídeos é geralmente fraca, bastante seletiva, mas não absoluta. Muitas lectinas toleram alguma variação no C-2 do



anel piranosídico. Por exemplo, lectinas manose específicas podem interagir com glicose (seu epímero) e vice versa. ConA, por exemplo, exibe especificidade para manose, mas pode ligar-se a glicose e a GlcNAc (SO & GOLDSTEIN, 1967). Da mesma forma, a maioria das lectinas com especificidade para galactose interage também com N-acetilgalactosamina. O grupamento OH de C-4 é crítico na interação com a lectina. Por exemplo, lectinas galactose-específicas não reagem com glucose ou manose, nem aquelas manose/glicose ligam-se à galactose, bem como, são raras as situações em que lectinas específicas para GlcNAc interagem com N-acetilgalactosamina.

Qualquer que seja a forma de interação das lectinas com carboidratos, a relevância biológica da atividade dessas proteínas reside no fato de que a sua ligação com um dos numerosos monossacarídeos encontrados na natureza ocorre a um nível milimolar, tornando-as altamente seletivas e atuantes como moléculas de reconhecimento em diversos sistemas biológicos (LIS & SHARON, 1998).

A especificidade das lectinas por carboidratos é usualmente determinada por técnicas de inibição do hapteno, nas quais diferentes monossacarídeos, oligossacarídeos ou glicoproteínas são avaliados em sua capacidade de inibir a hemaglutinação ou a precipitação entre a lectina e uma molécula reativa polissacarídeos pela lectina (GOLDSTEIN & HAYES, 1978). Qualquer que seja a técnica empregada para avaliar tal característica é da maior importância estabelecer a melhor estratégia para a purificação da lectina, bem como para usá-la como ferramenta em estudos bioquímicos e imunoquímicos (MOREIRA, 1998).

## **1.2 Lectinas de *Lablab purpureus***

Anteriormente denominada *Dolichos lablab*, a espécie *Lablab purpureus* var. *lignosusus* Sweet pertence à família *Leguminosae*, subfamília *Papilionoidae*. Conhecida como "*Hyacinth Bean*", esta leguminosa é originária da Ásia tropical, sendo atualmente cultivada em países como Índia, Turquia, Sudão, Egito e Austrália como fonte de alimentos para consumo humano e animal. No Brasil, essa espécie tropical é encontrada na Bahia, particularmente na região do Riacho

da Guia, onde suas sementes são popularmente conhecidas como “feijão mangalô” (Figura 3) e constituem iguarias bastante apreciadas pela população da região (SILVA-LIMA *et al.*, 1998).

A utilização do *L. purpureus* como fonte de alimentos deve-se principalmente à qualidade nutricional das sementes, as quais são ricas em proteínas que representam 20 a 28% de seu peso bruto. Além do alto teor de nitrogênio protéico, as sementes secas do mangalô contêm carboidratos (sacarose, glicose, galactose e amido), lipídios (ácidos graxos e estigmasterol) e vitaminas (A, B e C). No entanto, a exploração agrônômica dessa leguminosa envolve, além de características nutricionais, algumas proteínas dotadas de propriedades biologicamente ativas. Esses dados vêm instigando pesquisadores a investigarem nessas sementes a presença de substâncias de inestimável valor biológico, sejam os inibidores de proteinase, os inibidores de alfa amilase ou as lectinas.

A presença de hemaglutininas em sementes *L. purpureus* já é conhecida há muito tempo (SALGARKAR & SOHONIE, 1965). Alguns autores já revelaram a existência de várias lectinas com diferentes padrões de ligação a carboidratos. GURAN *et al.* (1983) obtiveram bons resultados com o isolamento de uma lectina de variedade cultivada na Turquia, cuja atividade hemaglutinante foi inibida por  $\alpha$ -metil-manopiranosídeo, GlcNAc e ovomucóide. Já KUMAR & RAO (1986), trabalhando variedades indianas (*var. typicus* e *var. lignosus*), purificaram duas lectinas, cada uma com quatro subunidades similares de massa molecular aparente de 15.000 kDa. Manose e glucose foram os mais potentes inibidores da atividade hemaglutinantes dessas proteínas. FAVERO *et al.* (1986 e 1988) referiram o isolamento de uma lectina com quatro subunidades, de 14 000, 24 000, 28 000 e 32 000 kDa, que era inibida por GlcNAc, glicose, manose, D-glucosamina e  $\alpha$ -metil-D-glicopiranosídeo. O isolamento dessa lectina, tal como foi feito por esses autores, divergiu de KUMAR & RAO (1986) e de GURAN *et al.* (1983). Em virtude das distintas variedades estudadas por esses pesquisadores, associada às diferentes metodologias de purificação empregadas, encontraram-se aspectos contraditórios na caracterização das lectinas no tocante ao açúcar inibidor da atividade biológica. Apesar disso, pôde-se observar similaridades com

relação á presença de subunidades proteicas com massas moleculares aparentes dentro do limite de 15.000 a 40.000 kDa.

No nosso laboratório, SILVA-LIMA *et al.* (1988) desenvolveram estudos pioneiros acerca da atividade hemaglutinante de lectinas de *L. purpureus* (L) Sweet, oriundas do Estado da Bahia. Esses autores mostraram que a aglutinação de hemácias de coelhos induzida por extrato total e frações proteicas, parcialmente purificadas dessas sementes, era inibida pelos açúcares GlcNAc (3mM),  $\alpha$ -metil-manopiranosídeo (3mM), D- manose (6mM) e D- glucose (12mM). Posteriormente, LEOPOLDO *et al.*(1994) utilizaram uma coluna de quitina para separar quatro lectinas com distintos padrões de ligação a carboidratos: GlucNAc, galactose, manose e glucose.

Esses resultados são semelhantes aos obtidos por MO *et al.*, (1990), que evidenciaram a presença de lectina com afinidade por manose nas sementes dessa variedade. Em estudos mais recentes, MO *et al.*(1999) utilizaram coluna de afinidade ovalbumina-sepharose 4B e purificaram a lectina a partir de cromatografia de filtração em gel, massa molecular aparente de 67 kDa. A eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) mostrou cinco bandas protéicas, cada uma com massa molecular aparente variando entre 10 e 22 kDa. As propriedades de ligação a carboidratos dessa lectina foram detalhadamente determinadas através de ensaios de inibição de hemaglutinação, inibição de precipitação quantitativa e ELISA. Os autores concluíram que dos monossacarídeos testados, somente D-manose, D- glucose e GlcNAc foram bons inibidores da atividade lectínica.

A seqüência de aminoácidos completa de duas subunidades não idênticas dessa lectina foi determinada por GOWDA *et al.*(1994), que descreveram a lectina isolada por MO *et al.* (1990) como uma glicoproteína glucose/manose ligante dotada de duas cadeias polipeptídicas que apresentam 105 e 135 resíduos de aminoácidos. Essa seqüência, quando comparada à de várias outras lectinas de leguminosa têm homologia com àquelas glucose/manose específicas, especialmente à concanavalina A (ConA). A análise da seqüência N-terminal de uma dessas bandas indicou sítios de clivagem pós-traducionais.



### 1.3 Aspectos Gerais dos Mecanismos da Resposta Imune Inata e Adquirida

A imunidade (do latim *immunitis*, livre de doença) é dependente da existência de um sistema de defesa complexo e altamente sofisticado, que pode virtualmente reconhecer qualquer molécula estranha, denominada antígeno, contra o qual produz uma resposta apropriada. Esse sistema é subdividido em duas categorias importantes, inata e adaptativa, cada uma dotada de um ramo humoral e outro celular (CARROLL & PRODEUS, 1998).

A resistência inata é descrita como a primeira linha de defesa do hospedeiro contra agentes infecciosos. Seus componentes celulares e humorais são idealmente adaptados para que suas ações não dependam essencialmente de sensibilização ou impressão prévia por antígenos, não possuindo, além disso, a especificidade fina à molécula estranha que é característica das respostas imunes adaptativas. Todavia, em anos recentes tem havido uma mudança gradual no foco de estudos da imunologia, de maneira que a visão consagrada da imunidade inata, no que concerne à sua especificidade, vem sofrendo modificações. Tem sido observado claramente que as respostas imunes inatas exibem um certo grau de especificidade e que esse sistema apresenta complexidade maior do que se supunha. Estudos da imunidade inata têm levado à descoberta de mecanismos moleculares que incluem receptores celulares e plasmáticos capazes de reconhecer classes de moléculas antigênicas altamente conservadas em microrganismos (PETERSEN *et al.*, 2001; MARCIANI, 2003; ANDERHILL & GANTNER, 2004).

Ao contrario da imunidade inata, a imunidade adaptativa ou adquirida, além de altamente seletiva para entidades estranhas ao organismo (*no self*), possui uma memória imunológica, cuja função é aumentar a magnitude e a capacidade de defesa do hospedeiro a cada exposição a um determinado antígeno (ZINKERNAGEL, 2003). Apesar das distinções entre os mecanismos efetores celular e humoral, bem como entre imunidade inata e adquirida, serem úteis para o entendimento da complexidade dos mecanismos de defesa do hospedeiro é

extremamente importante enfatizar que a resposta imune como um todo apresenta ampla gama de células e moléculas que agem de forma interdependente ou sinergicamente, estimulando outras células e/ou moléculas. Todas essas possíveis interações e conexões múltiplas fazem com que os fatores inespecíficos envolvidos direta ou indiretamente nos mecanismos específicos de imunidade sejam extremamente complexos. MEDZHITOV & JANEWAY (2000) reforçam que os componentes efetores da resposta inata constituem um elo imprescindível à ativação da resposta imune adquirida.

Fatores humorais e celulares inespecíficos definem a expressão de moléculas coestimulatórias e citocinas efetoras que fornecem o sinal necessário para regular a ativação dos linfócitos B e T. Nessa instância, muitas evidências apontam para a importância das lectinas ligantes de manose (MBL), que oriundas do plasma na forma de complexos solúveis com diversas serino- proteases (MASPs), atuam no reconhecimento de carboidratos específicos entre as células fagocitárias e seus alvos, mediando a fagocitose não opsonizada ou lectinofagocitose. De outra forma, as MBL ativam o complemento induzindo reação inflamatória (PETERSEN *et al.*, 2001; DUARTE-ESCALANTE *et al.*, 2003). UNDERHILL & GANTNER (2004) destacaram o envolvimento dos Toll-like receptores (TLRs) na fagocitose e internalização do antígeno a ser apresentado ao sistema imune adaptativo. Essas moléculas incluem uma família de glicoproteínas transmembrana presentes em macrófagos, células dendríticas (CD) e algumas células epiteliais apresentadoras de antígenos (APCs). Segundo MARCIANE (2003), o mecanismo de sinalização das APCs (células apresentadoras de antígenos) envolve a participação dos TLRs, os quais, através de um domínio que reconhece moléculas conservadas de patógenos (PAMPs) e um domínio similar citoplasmático, correspondente ao domínio da interleucina 1 (IL-1), induzem a sinalização para a ativação dos fatores nucleares da APC (NF- $\kappa$ B) de forma similar aos receptores da IL-1. Essa sinalização resulta na expressão de vários genes para citocinas, na produção de ligantes co-estimulatórios e, finalmente na ativação da resposta imune adaptativa.

Os linfócitos T, CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>, através dos TCR, reconhecem antígenos que estão presentes em APCs associados aos complexos MHC-I e MHC-II,

respectivamente (MITCHEL *et al.*, 2001). Vale ressaltar que, quando ativados, o linfócito T, até então considerado “virgem”, origina células efetoras, cujos tipos principais, linfócitos T citotóxicas (CTL) e linfócitos T auxiliares (HTL), derivam das células CD8 e CD4, respectivamente. As células CD4 interagem com o complexo antígeno-MHC-II para produzir uma das gerações celulares: Th1 ou Th2. A primeira, com a finalidade de estimular a imunidade celular (CTL), produz citocinas pró-inflamatórias, como interferon gama (IFN- $\gamma$ ), IL-2 e fator de necrose tumoral  $\beta$  (TNF- $\beta$ ). A segunda produz as citocinas IL-4, IL5, IL6, IL-10 e IL10, que vão favorecer a imunidade humoral, e também inibir a interação entre HTL e Th1 (MURPHY & REINER, 2002).

Logo, as células Th1, através do seu padrão de produção de citocinas, são otimizadas para promover a proliferação e diferenciação de linfócitos B em plasmócitos e conseqüentemente, a síntese de determinadas classes ou subclasses de imunoglobulinas específicas, principalmente de IgG1, IgA e IgE. Contrariamente, os linfócitos são otimizados para ajudar as respostas imunes mediadas por células (MARCIANI, 2003).

### **1.3.1 Mecanismos de Imunoestimulação e de Ação adjuvante**

A indução de uma resposta imunológica efetiva contra antígenos injetados artificialmente é uma das mais antigas e ainda uma das mais desafiadoras áreas da ciência, não somente no contexto clínico com aplicação em saúde pública, mas também de grande interesse para o campo da biologia experimental. Com esse enfoque, pesquisadores de várias áreas das ciências biológicas e biomédicas conduziram esforços para a elaboração de modelos imunoestimulantes que pudessem aumentar a imunogenicidade do antígeno e/ou modular a resposta imunológica adequada a cada situação, seja através da restauração da resposta imune normal em condições imunocomprometidas, ou seja, através da estimulação do estado imune de indivíduos susceptíveis a invasões de agentes devido a fatores ambientais (ZINKERNAGEL, 2003).



O termo imunoadjuvante foi associado à história da imunologia básica e aplicado, quando RAMON (1924-1926) estudou a inflamação local causada por componentes bacterianos e correlacionou-a com o título de anticorpos. Logo, um amplo espectro de compostos, das mais diversas origens (bacteriana, vegetal, animal), foram sendo tradicionalmente reconhecidas como promotores da indução e ativação da resposta antígeno-específica por modulação do sistema imune, representando um ponto crítico na preparação de novas estratégias de imunização artificial (AUDBERT, 2003).

A classificação dos imunoadjuvantes esteve por muito tempo condicionada a sua natureza química, origem e propriedades físico-químicas (COX & COULTER, 1997). Recentemente, em função de relatos frequentes apontando divergências entre as propriedades imunomoduladoras de compostos químicos relacionados, alguns autores (PRESS, 2000; SCHIJNS, 2000; SING & O'HAGAN, 2001; AUDBERT, 2003) consideraram mais prudente classificar inicialmente os adjuvantes conforme a sua capacidade de estimular as subpopulações de Th1 ou de Th2 (associados a imunidade celular e humoral, respectivamente) e alternativamente, com relação à sua capacidade de estimular a imunidade inata ou adaptativa para posteriormente, subclassificá-los de acordo com a sua estrutura química. MARCIANE (2003) acrescenta, que a caracterização estrutural do composto adjuvante e a identificação de receptores celulares que estão associados com suas atividades elucidarão os mecanismos de ação em nível molecular. Tal sistema pode ser de grande utilidade no estabelecimento da relação estrutura-função, quando o objetivo é identificar os fatores farmacológicos responsáveis pela modulação imune.

Na perspectiva de caracterizar os diferentes fatores que estão associados ao mecanismo de ação dos adjuvantes, SCHIJNS (2000) sugeriu que essas substâncias podem ser categorizadas como instrumentos auxiliares que sobrepõem uma ou mais características aos antígenos pouco imunogênicos. Com essa perspectiva o autor estabeleceu cinco conceitos gerais de adjuvantividade.

O primeiro estabelece-se como um conceito geográfico de reatividade imune, uma vez que enfatiza a capacidade migratória da molécula imunizante para os

linfonodos regionais otimizando o número de linfócitos antígenos-específicos ativados. Esta teoria está alicerçada ao fato dos linfócitos T “virgens” circularem através do sangue e linfa, entre órgãos linfóides secundários (baço e linfonodos). Um segundo conceito diz respeito ao efeito depósito, quando os antígenos e adjuvantes ficam persistentemente seqüestrados no sítio de inoculação permitindo a captura e apresentação gradual dos mesmos pelas APCs . Em ambos os casos são ressaltados a localização do antígeno, a dose e o tempo da sua apresentação como requisitos essenciais para a reatividade imune.

O terceiro conceito, o qual retrata a teoria de sinalização “0”, consiste da ação de antígenos ou adjuvantes contendo moléculas conservadas que são reconhecidos por receptores específicos presentes em APCs. (MARCIANI,2003). O conceito seguinte aborda o dano molecular induzido ou representado pelo adjuvante ou antígeno. De acordo com SCHIJNS, nesse modelo, o qual denomina “*danger*”, os sinais oriundos da necrose tissular ou *stress* celular induzem a expressão de moléculas co-estimulatórias a partir das células APCs garantido a imunogenicidade do antígeno. Esse paradigma firma-se no fato de que o sistema imune distingue o tecido danificado do tecido ileso, tal como o próprio do não próprio.

Finalmente o último conceito, denominado “sinal recombinante 2”, enfatiza que a diferença fundamental entre a administração isolada do antígeno, resultando na baixa resposta imune, e a administração do antígeno associado ao adjuvante, é que nesse último caso ocorre indução de uma resposta inflamatória. Assim, as diferentes citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ ) produzidas por macrófagos ou células da imunidade inata no sítio de inoculação podem ser comunicadores essenciais da atividade adjuvante. Não obstante, o mecanismo pelo qual os adjuvantes induzem a produção desse protótipo molecular de iniciação, levando à polarização da resposta dos linfócitos Th ainda é desconhecido. Para ROMANI *et al.*(1997), a ativação seletiva de tipos particulares de células da imunidade inata ou a seleção de receptores específicos das mesmas seria uma possibilidade.

Certamente, o mecanismo de ação dos adjuvantes depende de numerosos fatores, dos quais muitos ainda permanecem desconhecidos. Segundo SINGH & O'HAGAN (2003), até o momento não está claro o efeito primário de um adjuvante e nem a cascata complexa de respostas que ocorre à partir da sua inoculação. A literatura contém uma quantidade razoável de novas substâncias imunomoduladoras bem definidas e, inclusive com mecanismo de ação sobre o sistema imune parcialmente elucidado.

Os adjuvantes à base de sais de alumínio, por exemplo, descritos há mais de setenta anos (GLENNY *et al.*, 1926, citados por MARCIANI, 2003), são até hoje os únicos licenciados nos Estados Unidos para o uso em vacinas humanas e animais. Todavia, essas moléculas ainda não são ideais para todas as situações, pois não estimulam resposta imunológica humoral eficiente contra todos os antígenos, e geralmente não induzem imunidade mediada por células. O adjuvante completo de Freund (composto de óleo mineral, agente emulsificante e a bactéria *Mycobacterium bovis*, morta pelo calor) e o adjuvante incompleto de Freund (semelhante ao adjuvante completo, sem a presença da bactéria) são preparações usadas há mais de cinquenta anos, sendo reconhecidas como excelentes potencializadores da resposta imune contra o antígeno, e por isso empregados amplamente em pesquisas, uma vez que induzem extraordinariamente as respostas imunológicas humoral e celular contra vários antígenos solúveis e particulados. No entanto, podem provocar a síntese de imunoglobulinas inespecíficas. Tanto esses adjuvantes como os sais de alumínio são ineficientes para desencadear respostas imunes contra proteínas de baixo peso molecular, particularmente, haptenos e peptídeos, a menos que estejam ligados covalentemente a moléculas maiores e imunogênicas.

### **1.3.2 Considerações sobre a Utilização de Lectinas Vegetais como Ferramenta Moduladora da Resposta Imunológica**

A estabelecida atividade de lectinas em reações de aglutinação e precipitação teve efeito estimulante sobre as pesquisas em imunologia. De fato, a descoberta



da propriedade eritroaglutinante da ricina, associada a sua notável toxicidade foram de grande valia para a elucidação das bases da resposta imunológica. Paul Ehrlich (1891), o pai da imunologia moderna, logo reconheceu nessas proteínas, modelos de antígenos mais úteis para estudos imunológicos do que as toxinas bacterianas. Elas eram mais fáceis de preparar, e muito mais estáveis, além de induzirem, quando injetadas em animais, altos títulos de anticorpos capazes de inibir tanto a atividade tóxica como a atividade hemaglutinante da lectina (MOREIRA, 1998).

No entanto, foi somente a partir da década de 60, em função da revelação da atividade mitogênica da lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) (NOWELL;1960), que a comunidade científica despertou para a utilização de lectinas vegetais como ferramenta experimental em estudos sobre fenômenos ligados a imunoestimulação (MOREIRA, 1998). Tal descoberta teve um impacto revolucionário ao desfazer a idéia de que os linfócitos eram células que já haviam atingido um estágio terminal, não podendo sofrer divisão ou diferenciação.

A capacidade de ativar linfócitos também foi conferida a outras lectinas vegetais, sejam elas: o mitógeno "pokeweed" (Pokeweed mitogen, PWM), isolado de *Phytolacca americana*; a Con-A e a PHA apresentavam mitogenicidade seletiva para linfócitos T, e a WGA, extraída do germe de trigo, em contraste às anteriores, induzia sinal negativo na ativação de linfócitos, resultando na inibição da proliferação dessas células. Hoje, é fato conhecido que algumas lectinas são ativadoras policlonais tanto *in vitro* quanto *in vivo*, outras podem exibir um amplo espectro de atividades sobre linfócitos humanos, uma vez que podem atuar tanto como mitogênica, comitogênica ou antimitogênica, dependendo das condições experimentais (KILPATRICK, 1999).

O efeito de lectinas vegetais sobre o aumento da síntese de DNA e na indução da transformação blástica de populações específicas de linfócitos pode ser comparada com a ativação por antígenos, uma vez que ambos induzem modificações morfológicas, modulação fenotípica de determinantes de superfícies e liberação de citocinas e imunoglobulinas. Em contraste com a ativação por antígenos, em que os clones específicos de linfócitos são induzidos a proliferar, a

estimulação mediada por lectinas leva à ativação policlonal de células que possuem os glicoconjugados de superfície reconhecidos pela lectina usada. Dessa forma, o fenômeno de estimulação policlonal por lectinas facilita enormemente o estudo e a detecção de mudanças associadas com a ativação celular (KILPATRIK, 1999).

As lectinas vegetais com atividade mitogênica foram amplamente utilizadas em ensaios imunológicos que tinham em vista seus diferentes efeitos linfocitários, sobretudo sua capacidade imunomoduladora sobre a resposta humoral. Assim, já em 1975, GOLLAPUD & KIND atribuíram à ConA efeito adjuvante sobre a produção de IgE anti-ovalbumina, e também ação indutora de altos títulos de IgE específica em camundongos. Posteriormente, foi mostrado que o mitógeno PWM estimula a produção de imunoglobulinas por linfócitos B, sendo esta produção regulada por células T auxiliares. A aglutinina extraída de germe de trigo (WGA), que embora não seja mitogênica, ainda é capaz de induzir resposta de anticorpos na presença de células apropriadas (MOREIRA, 1998).

O uso de lectinas em imunologia tem nova conotação quando se tem em vista que a diversidade de interações entre células e moléculas do sistema imune é mediada por lectinas e carboidratos e que estes estão largamente distribuídos, tanto nos tecidos dos mamíferos como dos microrganismos. Os carboidratos podem formar estruturas dotadas de maior variabilidade para codificar informações do que os ácidos nucléicos e peptídeos. Os mecanismos moleculares que habilitam o sistema imune a diferenciar o próprio do não próprio e desenvolver uma resposta imunológica apropriada envolvem principalmente padrões de reconhecimento específico de oligossacarídeos e estes são facilitados por associações de alta afinidade proporcionadas por ligações entre lectinas com diferentes subsítios de ligação a glicoconjugados (RUDD *et al.*, 2004).

Ademais, lectinas animais vêm sendo continuamente identificadas, seja fazendo parte de estruturas de superfície ou como componentes solúveis do sistema imune inato e adaptativo (RUDD *et al.*, 2004).

Por conta do crescimento da importância das lectinas animais como reguladores das células do sistema imune, alguns pesquisadores avaliaram o papel carreador de lectinas ligantes de Gal  $\beta$ 1-3GalNAc, tal como a jacalina, na estimulação da produção de anticorpos contra o hapteno trinitrofenil (TNP) e contra *Trypanosoma cruzi* (ALBUQUERQUE *et al.*, 1999). Utilizando a mesma lectina, KABIR (2000) demonstrou que esta aglutinina pode ser usada como ferramenta para avaliar o *status* imune de pacientes infectados com o vírus HIV-1, uma vez que associando-se ao complexo receptor de células T, a lectina promove um sinal co-estimulador positivo, conduzindo a produção de interleucina 2 (IL-2) e seus receptores (IL-2R). Para esse autor, as diferenças no reconhecimento da glicoproteína da superfície dos linfócitos pelas lectinas, podem ter importância no direcionamento da via estimulatória ou na identificação seletiva das subpopulações celulares Th1 e Th2 e conseqüentemente, na síntese de anticorpos específicos. Por outro lado, a ligação da lectina a glicoproteínas na membrana resultam em interações que podem ou não ser funcionalmente relevantes.

LAVELLE *et al.*, (2002) avaliaram a resposta humoral sistêmica e local de camundongos imunizados nasal e oralmente com aglutininas específicas para diferentes carboidratos, acreditando que a interação entre lectinas vegetais e receptores glicídicos presentes na mucosa intestinal e nasal otimizaria a apresentação do antígeno ao sistema imune das mucosas. Para tanto, esses autores compararam a correlação entre imunogenicidade e adjuvanticidade, revelando que a aglutinina 1 de *Ulex europeus*, uma lectina fucose específica, e a WGA induziam a produção de altos títulos de IgG anti-OVA, enquanto provocavam uma resposta lectina-específica relativamente baixa.

Do mesmo modo, TRIPATHI & MAITI (2005), investigando o efeito modulador e imunogênico da lectina isolada de *Abrus precatorius*, postulou que essas proteínas promovem resposta imunológica específica, provavelmente através da ligação com glicoconjugados de superfície de células APC, provocando *paching* ou *capping* e conseqüente endocitose, processamento e apresentação do complexo lectina-glicoconjugado aos linfócitos. Desse modo, à semelhança da



estimulação antigênica dos linfócitos, a ativação mediada por lectinas parece ser dependente de células acessórias, mas está principalmente condicionada à presença do carboidrato ligante na superfície das mesmas.

As lectinas de *Lablab purpureus* protagonizaram uma rica história de aferições imunológicas. Os primeiros relatos, apresentados por FAVERO *et al.* (1986-1988) indicaram a atividade mitogênica do extrato total e de frações cromatografadas em Sephadex G-100. O pico eluído com glucose 0,2 M em PBS, além de potente mitógeno para linfócitos T murinos, atuou na síntese de IL-2. Em outro estudo, CAMPOS (1990) demonstrou que o extrato total de *L. purpureus* é mitogênico para esplenócitos normais de camundongos.

PROVOUST-DANON *et al.*(1992), utilizando sementes de *L. purpureus* oriundas da Bahia, variedade estudada no nosso laboratório, demonstraram, através da técnica de anafilaxia passiva cutânea, o efeito de frações parcialmente purificadas na estimulação de basófilos e mastócitos com liberação de histamina, mediada por IgE. Nesse estudo, as aglutininas de *L. purpureus* mostraram-se mais eficientes do que a Con A na indução da liberação de histamina por células humanas, entretanto quando foram utilizados mastócitos de camundongos, a Con A apresentou efeito mais expressivo. A quantificação de anticorpos das classes IgG e IgA no soro de camundongos inoculados com ovalbumina associada a frações protéicas hemaglutinantes, parcialmente purificadas dessa mesma variedade de *L. purpureus*, indicou que essas lectinas são imunogênicas e moduladoras de resposta humoral para esse antígeno (ARAGÃO, 1990).

Com resultados mais recentes, PEREIRA (2000) demonstrou que as proteínas hemaglutinantes contidas no extrato total de *L. purpureus* originária da Bahia eram responsáveis pelos altos títulos de anticorpos das classes IgG e IgA produzidos em camundongos imunizados oralmente. Esse efeito foi inibido pelos açúcares GlcNAc (62%), manose (48,38%), glucose (43,38%) e galactose (30,92%).



## **1.4 Aspectos Gerais de Fungos de Interesse Médico**

A micologia, por seus vários ramos de atuação, vem recebendo aumento gradual de importância, que implica em relevante papel para a micologia médica, ciência especializada em estudar os fungos e as doenças por eles causadas no homem e em outros animais. Nesse contexto, destacam-se os dermatófitos como principais fungos responsáveis pela ocorrência de patologias cutâneas no homem e em várias espécies de animais; e as leveduras do gênero *Candida*, como causadoras das mais frequentes infecções fúngicas oportunistas (SIDRIM & ROCHA, 2004).

### **1.4.1 *Microsporium canis***

O grupo dos dermatófitos inclui as espécies dos gêneros *Microsporium*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* que se apresentam como fungos filamentosos, hialinos, septados e algumas vezes artroconidiados passíveis de invadir e colonizar o extrato córneo ou estruturas queratinizadas da epiderme e derivados, causando alterações clínicas na pele, pêlos e unhas de um amplo espectro de hospedeiros, que na maioria das vezes, manifestam a doença através de lesões tipicamente discretas, circulares com áreas de perda pilosa. Na dependência de aspectos geográficos e ecológicos, conhece-se hoje uma infinidade de espécies de dermatófitos envolvidas em casos clínicos humanos e animais (DUEK *et al.*, 2004; SIDRIM & ROCHA, 2004).

O *Microsporium canis* é considerado uma espécie cosmopolita e zoofílica que tem como principais reservatórios felinos jovens, nos quais é o fungo mais frequentemente envolvido em processos infecciosos no meio urbano e o mais isolado na nossa região (BRILHANTE *et al.*, 2003). Esse fato, também demonstrado em várias outras regiões do mundo (FLAMMIA *et al.*, 1995), aponta para esse dermatófito um papel de destaque em saúde pública, uma vez que é primariamente transmitido ao homem através do contato com pequenos animais domésticos, os quais, manifestando a doença ou não, podem curar-se

espontaneamente ou permanecer infectados durante anos e assim, distribuir no ambiente artrosporos<sup>1</sup>, que são formas infectantes resistentes e difíceis de serem removidas, podendo manter-se viáveis no ambiente por mais de um ano. Dessa forma, a detecção precoce desse fungos nos animais, o tratamento dos mesmos e o controle do ambiente constituem eficientes medidas profiláticas para a dermatofitose humana (MANCIANTI *et al.*, 1999; MANCIANTI *et al.*, 2003; VERMOUT *et al.*, 2004).

Quando cultivado em ágar Sabouraud, o *M. canis* apresenta crescimento moderadamente rápido, produzindo colônias de textura algodonosa em sete a dez dias de incubação à temperatura ambiente. Além da presença de hifas septadas, a análise microscópica dessas colônias revela, na maioria das vezes, estruturas de frutificação<sup>2</sup>, que consistem principalmente de macroconídios fusiformes verrucosos de paredes grossas e com numerosas septações. Os microconídios raramente estão presentes e não mostram nenhum valor diagnóstico. A identificação desses fungos baseia-se fundamentalmente nessas características morfológicas, que muitas vezes não se manifestam tipicamente, dificultando o diagnóstico laboratorial (SIDRIM & ROCHA, 2004).

De modo geral, o desenvolvimento de processos infecciosos por dermatófitos inicia-se à partir do estabelecimento dos artrosporos no extrato córneo do hospedeiro (RASHID, 2001). À despeito dos poucos fundamentos bioquímicos que abordam os mecanismos de interações iniciais, estudos *in vitro* têm mostrado que os artroconídios atingem aderência máxima no extrato córneo em três à quatro horas de contato (TSUBOI *et al.*, 1994; DUCK *et al.*, 2004). No entanto, se uma vez aderidas, essas estruturas falharem em produzir o tubo germinativo, a lesão não é produzida. A germinação do tubo germinativo ou hifa primária pode ser favorecida por vulnerações imunológicas locais associadas a lesões cutâneas pré-existentes (VERMOUT *et al.*, 2004); o filamento fúngico progride no curso dessa

---

<sup>1</sup> Artrosporos: também denominado artroconídio, por tratar-se de um propágulo fúngico, consiste do produto da desarticulação geneticamente programada da hifa septada. É a forma rígida em que os dermatófitos apresentam-se em seu estágio parasitário (RASHID, 2001).

<sup>2</sup> Estruturas de frutificação: propágulos oriundos dos processos reprodução assexuada que na dependência da espécie fúngica produtora, apresentam-se em formas variadas, constituindo um importante critério



lesão, por mínima que esta seja, e, utilizando-se de enzimas proteolíticas, invade a camada córnea da epiderme (LOPEZ-MARTINEZ et al., 1994; MUHSIN & SALIH, 2001).

O pêlo é atingido de forma secundária à pele, quando o crescimento dicotômico das hifas encontra o orifício piloso. A partir daí, o dermatófito invade a camada córnea da epiderme, aprofundando-se no folículo piloso. Quando atinge o infundíbulo, remove a cutícula do pêlo, e passa a consumir toda a sua fonte de queratina até que esta cesse na região mais profunda do mesmo. Nesse estágio, o fungo pode equilibrar dois movimentos contrários: aprofundando-se no pêlo, utilizando a queratina recém formada ou retrocedendo para a sua superfície, na região do infundíbulo. Nos felinos e caninos infectados por *M. canis*, a análise microscópica dos pêlos, previamente tratados com KOH a 40%, revela a presença de numerosos artrosporos bastante aglomerados. Esse aspecto indica as particularidades do parasitismo piloso desse fungo, o qual é denominada pelos micologistas de microspórico ectotrix (SIDRIM & ROCHA, 2004).

#### **1.4.2 *Candida spp***

Durante muito tempo, acreditou-se que apenas *Candida albicans* era capaz de causar doença no homem e animais; hoje, no entanto, sabe-se que, em grande maioria, as leveduras são capazes, em condições especiais do hospedeiro, de causar diversos tipos de quadros clínicos, que vão desde manifestações banais, como a colonização de mucosas, até quadros sistêmicos com a invasão de vários órgãos. As espécies mais comumente implicadas em processos clínicos, denominados candidíases, são: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei*, além de outras menos frequentes (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Na condição de fungos oportunistas, as leveduras interagem com seus hospedeiros de duas formas distintas: comensal ou patogênica. A passagem do *status* de comensal para fungo patogênico é acompanhada por de fatores

---

taxonômico para fungos filamentosos de interesse médico. Os dermatófitos produzem tais estruturas nas formas denominadas macro e microconídios (SIDRIM & ROCHA, 2004).

imunológicos do hospedeiro e por modificações biológicas, genéticas e antigênicas, que em primeira análise implicam na expressão de fatores virulência, que podem estar relacionados tanto nos processos de aderência como na produção de enzimas e toxinas, ou ainda na evasão das defesas do hospedeiro. Nessa perspectiva, alguns pesquisadores revelaram que características da parede celular dessas levedura exercem grande efeito nos processos de adesão e reconhecimento celular no hospedeiro. Podem ser citadas as propriedades eletrostáticas, tais como a hidrofobicidade, como também os resíduos de carboidratos de manoproteínas e a presença de ácido siálico (TSUBOI *et al.*, 1994; SOARES *et al.*, 2000; LOYOLA *et al.*, 2002). Segundo DATRY & TELLIER (2001), a *C. albicans* utiliza-se de suas propriedades de aderência para estabelecer-se na superfície do epitélio e, a partir daí, iniciar o processo infeccioso que implica em mudanças morfológicas, tal como a emissão do tubo germinativo.

### **1.4.3 Parede Celular de Fungos**

A parede celular, tal como o citoplasma e núcleo, é uma estrutura observada de modo constante na arquitetura da célula fúngica. Um vez que constitui a superfície de contato desses organismos com o meio externo, nela observa-se uma gama de fatores relacionados a aglutinação, crescimento e interações enzimáticas implicadas na digestão de substratos nutritivos complexos. É portanto, instrumento indispensável para as vias metabólicas, para a manutenção da homeostase e para as inter-relações celulares, no que diz respeito, tanto ao crescimento e reprodução da célula fúngica, como às suas interações com tecidos hospedeiros, no curso de um processo infeccioso (SIDRIM & ROCHA, 2004).

OSUME (1998) argumentou que, sob o ponto de vista da patologia e da terapêutica, a parede da célula fúngica representa o alvo inicial de defesa do hospedeiro contra as infecções micóticas, visto que, com relação à célula animal, o invólucro celular rico em quitina é peculiar nos fungos. No entanto, para esse pesquisador os limitados fundamentos sobre as características biológicas da



estrutura fúngica aliado às informações fragmentadas acerca dos mecanismos básicos de virulência de espécies patogênicas, ainda constituem obstáculos para a introdução de novas estratégias contra as doenças causadas por micromicetos.

Com base em estudos pioneiros, BARTINICKI-GARCIA (1968) descreveu a parede celular de fungos filamentosos como uma estrutura extremamente versátil, uma vez que pode ser continuamente expandida e extensivamente remodelada durante o seu crescimento e fases reprodutivas. RUIZ-HERRERA *et al.*(1992), utilizando técnicas bioquímicas, genéticas e citológicas, estudaram a parede celular de vários fungos, nas formas de levedura e micelial, em diversos estados de reprodução, determinando os seus componentes estruturais, sua síntese e sua função. Baseado nos resultados obtidos por esses autores, a Tabela 1 demonstra, os diferentes carboidratos observados na parede celular fúngica.

**TABELA 1. Diferentes polissacarídeos observados na parede fúngica**

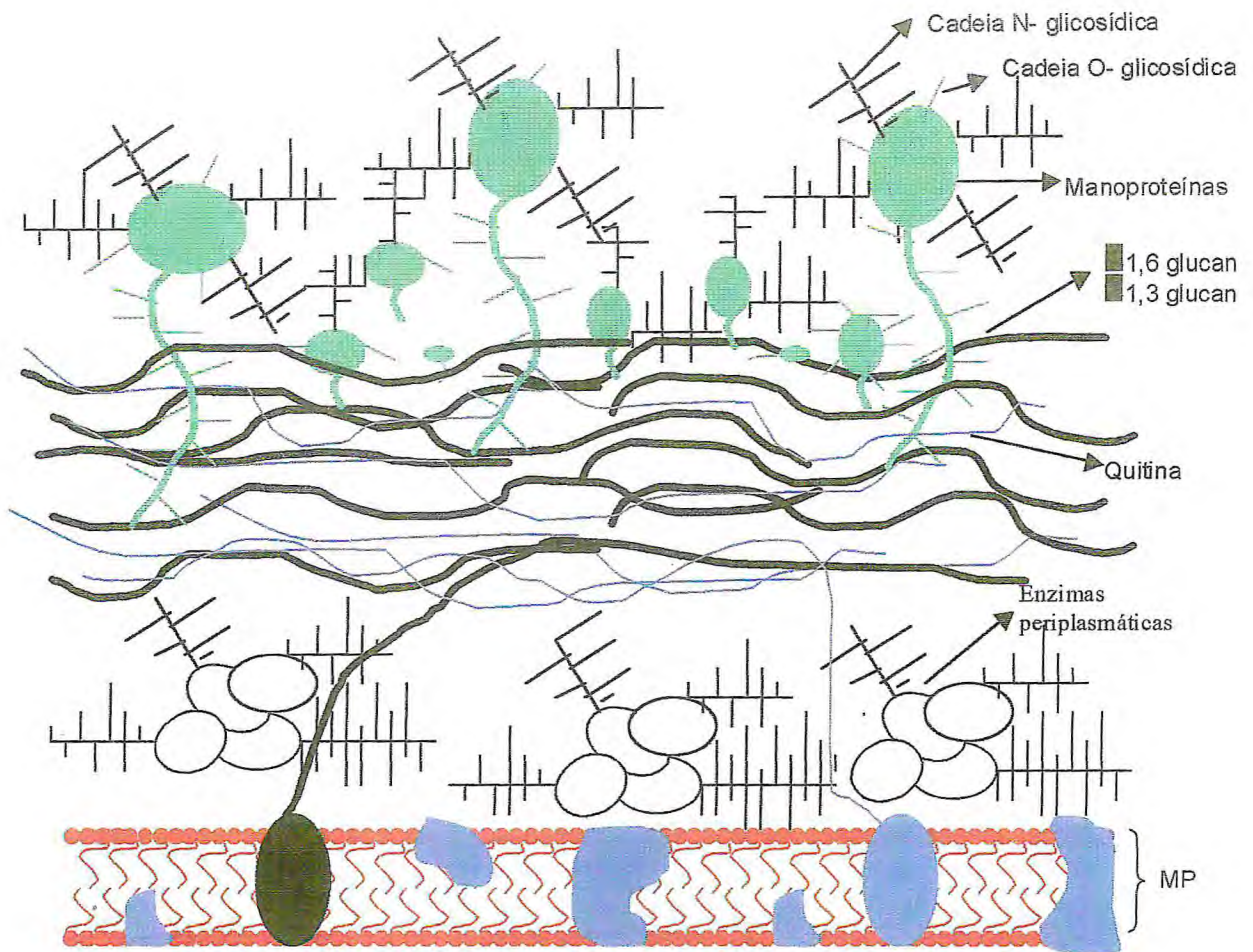
<b>Polissacarídeos</b>	<b>Manômeros</b>	<b>Ligações</b>
Quitina	GlicNac	$\beta$
Celulose	Glucose	$\beta$
$\beta$ -glucana	Glucose	$\beta$ $\beta$
$\alpha$ -glucans	Glucose	$\alpha$ - $\alpha$ -
Quitosan	Glucosamina	$\beta$
Poliuronídeos	Ácido glicurônico e açúcares neutros	
Mananas de glicoproteínas	Manose, GlicNac e outros açúcares neutros em menores quantidades	$\alpha$ - $\alpha$ - $\alpha$ -

Fonte:GOZALBO et al, (1993), modificado de RUIZ-HERRERA, (1992)

KITAGIMA (2001), através de estudo ultraestrutural e bioquímico de sistema de membranas de hifas de dermatófitos, especificamente de *Trichophyton mentagrophytes* e de *Epidermophyton floccosum*, detalhou que a parede celular desses fungos tem espessura de aproximadamente 0,1 a 0,5 $\mu$ m e é fisicamente formada por microfibrilas entrelaçadas, medindo aproximadamente 20 nm de diâmetro, embebidas numa matriz amorfa. Quitina, um polímero de  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-N-acetil-d-glucosamina, é o principal componente microfibrilante, sendo observados na proporção de 70 a 80%, enquanto que glucanas estão presentes em menor quantidade. Proteínas e vários polissacarídeos ( $\beta$ -1-3,  $\beta$ -6 glucan, glucomananas, galactomananas), alguns associados a polipeptídeos, representam a maioria das substâncias matriciais. Nesse estudo, foi revelada a presença de uma camada mais externa, de aproximadamente 20-50nm de espessura, formada por proteínas e glicoproteínas hidrofóbicas.

A parede celular de leveduras, particularmente de *Candida albicans*, também consiste de uma rede microfibrilar, representada principalmente por glucanas e, em menor quantidade por quitina que, mais abundante nessa espécie do que em outras leveduras como *Saccharomyces cerevisidae*, distribui-se por toda a parede celular (GOZALBO *et al*, 1993). Segundo RICO *et al* (1997), cada um desses componentes exerce uma função específica. As microfibrilas de glucanas e de quitina, entremeados com manoproteínas, conferem rigidez à parede celular, enquanto as manoproteínas determinam a forma da levedura. Tais descrições integram o modelo proposto por OSUME (1997), o qual representa a disposição dos diferentes componentes químicos na parede celular de *C. albicans* (Figura 1).





**Figura 1. Modelo da arquitetura da parede celular de *Candida albicans*.** Os componentes microfibrilares principalmente glucanas e quitina, em menor quantidade, são vetorialmente expelidos por suas respectivas sintetases a partir da membrana plasmática (MP). Expandindo-se através de toda a parede celular estão as manoproteínas, as quais são secretadas a partir do espaço periplasmático. Diversas espécies de manoproteínas interagem com glucana e quitina por ligações covalentes, permitindo a estruturação da parede celular, enquanto outras permanecem embebidas na matriz amorfa.  
Adaptado de GOZALBO *et al.*(1993) e de OSUME (1998)

#### 2.4.5 Considerações sobre a Utilização de Lectinas Vegetais em Micologia

As altas concentrações de lectinas em muitas sementes e evidências de que apreciáveis quantidades de lectinas são exsudadas da semente para o meio externo durante a germinação acrescentaram às lectinas um papel de proteção durante os primeiros estágios de desenvolvimento da planta, que podem estar correlacionados à funções anti-microbianas, incluindo a ação anti-fúngica dessas proteínas (VAN DAMME *et al.*, 1991 ).

Imbuídos do conhecimento de que nas sementes de diversas espécies de leguminosas estão presentes hemaglutininas com potencial antimicrobiano, pesquisadores iniciaram uma corrente de investigações acerca do efeito deletério dessas moléculas sobre fungos fitopatogênicos. Dessa forma, relatos sobre o papel antifúngico de lectinas já surgiram em décadas passadas, quando foi mostrado por MIRELMAN *et al.*(1975) que a WGA ligava-se e inibia o crescimento de hifas de *Trichoderma viride*, um fungo fitopatógeno, aparentemente interferindo na síntese de quitina da parede celular. CIOPROAGA *et al.* (1999) acreditando que uma das funções naturais dessa lectina é proteger o germe de trigo da invasão e dos danos causados por fungos específicos, mostraram que os efeitos da WGA sobre espécies fitopatogênicas de *Fusarium sp* envolvem o compartimento interno da célula e o crescimento do tubo germinativo, uma vez que foram observadas dramáticas mudanças na morfologia fúngica, incluindo lise da extremidade da hifa, intumescência e vacuolização do conteúdo celular, provavelmente devido à sensibilidade maior à lise osmótica que leva a destruição da célula fúngica. Outra proteína (heveína), com características de merolectina, encontrada em látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*), também interagia com moléculas precursoras de quitina, impedindo a formação e a renovação da quitina das paredes das hifas (ALEN *et al.*, 1973).

TEL, uma nova lectina isolada de *Talisia esculenta* ou "pitomba", com afinidade para manose, glucose e GlcNAc, embora não tenha provocado modificações morfológicas na formação das hifas, foi eficiente em inibir o

crescimento dos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lindemuthianum* e *Saccharomyces cerevisiae* (FREIRE *et al.*, 2001). Essa lectina consiste de uma glicoproteína dependente de  $\text{Ca}^{+2}$  composta de duas subunidades (40 e 20 kDa), ligadas não covalentemente, cuja seqüência  $\text{NH}_2$  terminal não apresenta homologia com outras lectinas vegetais, e sim com algumas proteínas de reserva e de defesa de plantas.

Características antifúngicas também foram observadas nas proteínas de sementes de *L. purpureus*. Dessa leguminosa, YE *et al.*(2000) isolou proteína ligante de quitina, a qual designou doliquina, que inibiu o crescimento dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Coprinus comatus*. Com interesse semelhante, FAKHOURY & WOLOSHUK (2001) determinaram ação antifúngica de um inibidor de  $\alpha$ -amilase, com atividade lectínica, no extrato protéico dessas sementes. Tal proteína foi capaz de inibir a germinação conidial e o crescimento de hifas de *Aspergillus flavus*.

Apesar dos valiosos dados sobre o efeitos antifúngicos de lectinas, o mecanismo pelo qual essas proteínas afetam o crescimento do fungo ainda não foi totalmente esclarecido. O efeito de proteínas ligantes de quitina sobre o crescimento de patógenos que possuem esse polissacarídeo em sua estrutura indicam que a lectina pode fragilizar o desenvolvimento da parede celular fúngica através da sua ligação com polímeros da rede fibrilar e assim desestabilizar a relação entre hidrólise e síntese do invólucro celular (MERZ, R.A., 1999).

Há mais de três décadas, pesquisadores utilizando outra abordagem, vem apontando para o uso de lectinas vegetais como reagentes úteis no estudo da superfície da célula fúngica com amplas perspectivas de desempenhar também um papel de valor na classificação desses organismos (TRACZ *et al.*, 1971; STODDART & HERBERTSON, 1978; POTTS *et al.*, 2001).

Uma das principais vantagens de aplicação das lectinas em micologia é que os sítios receptores da superfície fúngica podem ser parcialmente caracterizados por estudos de inibição do hapteno. Diferentemente de outros instrumentos, como os anticorpos monoclonais, os quais requerem obtenção laboriosa, as lectinas vegetais são obtidas e utilizadas de forma simplificada, uma vez que, além de



apresentarem excelente estabilidade ao calor, não necessitam do pré-tratamento antigênico e inoculação em animais para a obtenção do antissoro. Quando conjugadas a marcadores histológicos, seja fluoresceína, peroxidase ou colóides de ouro, essas proteínas reconhecem resíduos de carboidratos específicos, e desse modo, podem ser empregadas como marcadores de superfície da célula fúngica, com amplas perspectivas de aplicação em técnicas histoquímicas para detecção de fungos patogênicos em amostras clínicas humanas e animais destinadas ao diagnóstico laboratorial (SLIFKIN & DOYLE, 1990; GARCIA *et al.*, 2002).

Favoráveis a essa perspectiva, muitos estudos utilizaram com êxito lectinas conjugadas a isotiocianato de fluoresceína (FITC), contribuindo para o esclarecimento da natureza química da parede celular de fungos e determinaram diferenças e mudanças estruturais de glicoconjugados presentes na superfície de diferentes espécies de fungos e em variados estados morfológicos de vida, (GOZALBO *et al.*, 1993; RICO *et al.*, 1997). De fato, o padrão de ligação de uma determinada lectina com a superfície da célula fúngica notavelmente expressa o perfil bioquímico da parede do respectivo fungo examinado, principalmente com relação à composição glicídica. Como exemplo, podem ser citados os trabalhos desenvolvidos por BARKAI-GOLAN & SHARON (1978) que revelaram que o número de ligações que a ConA, conjugada à FITC, estabeleceu com a parede celular de espécies de *Candida* está relacionado à presença abundante de resíduos  $\alpha$ -D-manosil na superfície da levedura. Nesses mesmos estudos, a ConA, apesar de ter reagido de forma semelhante com a levedura *Saccharomyces bayanus*, não apresentou atividade com resíduos de carboidratos da superfície de *Schizosacchomyces pombe* ou *Rhodotorula glutinis*, fato que evidenciou a carência de receptores  $\alpha$ -D-manosil na parede celular desses fungos (SLIFKIN & DOYLE, 1990).

Lectinas mais estudadas, como a WGA e a ConA já vem sendo amplamente empregadas como instrumentos de valor em estudos sobre a composição e mudanças bioquímicas que ocorrem no processo de síntese da parede celular de fungos, bem como as alterações estruturais decorrentes da ação

de substâncias antifúngicas. Com esse objetivo, MARES *et al.*, (2002) empregaram ConA conjugada à FITC para identificar mudanças na composição glicídica da parede celular de *Epidermophyton floccosum*, previamente tratados com derivados azois.

## 2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

---

A grande ocorrência, alta estabilidade térmica e, principalmente, a propriedade bem definida de ligação com carboidratos tornam as lectinas vegetais ferramentas importantes no campo da glicociência. As propriedades biológicas dessas proteínas são discutidas há décadas. Entretanto, para o entendimento da abrangência de suas potencialidades como promissoras ferramentas experimentais a serem utilizadas em ciências biomédicas é preciso entender a multiplicidade de interações nas quais as lectinas são capazes de se engajar (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). A exploração dessas moléculas nos diversos grupos botânicos que compõem a flora brasileira aliado a investigações que avaliem suas aplicabilidades constituem importantes estratégias para o desenvolvimento biotecnológico.

Tem sido bem demonstrado que a interação entre células e moléculas do sistema imunológico é mediada por lectinas e carboidratos que estão amplamente distribuídos nessas estruturas. Essa evidência é considerada quando se tem em vista a utilização de lectinas vegetais, já conhecidas ativadoras policlonais, como ferramentas que possam mediar o reconhecimento antigênico e ampliar seletivamente a resposta imunológica humoral.

Dados anteriores já indicaram efeitos mitogênicos e antigênicos em aglutininas ligantes de glucose-manose extraídas de sementes de *Lablab purpureus* (L) Sweet. No entanto, a literatura consultada ainda apresenta lacunas com relação as propriedades imunomoduladoras das frações ligantes de glucose-manose. e sobretudo purificadas em coluna Ovalbumina-sepharose.

Algumas pesquisas indicaram as potencialidades antifúngicas de proteínas de sementes *Lablab purpureus*. A inexistência de dados que impliquem tais efeitos em lectinas presentes nos extratos proteicos extraídos das sementes dessa variedade aliada a multiplicidade de pesquisas que apontaram a reatividade de outras lectinas vegetais com resíduos de glucose, manose e N-acetilglucosamina



da parede da célula fúngica constituem importantes fundamentos para que sejam avaliados os efeitos da lectina de *Lablab purpureus* sobre fungos.

Embora a maioria das observações concernente à ação antifúngica de lectinas de origem vegetal reporte-se principalmente aos fungos fitopatogênicos, a aparente semelhança na composição bioquímica da parede entre esses microrganismos, sobretudo com relação à presença abundante de carboidratos permite considerar oportuno investigar no mesmo contexto os efeitos dessas moléculas sobre o crescimento de fungos de interesse médico, uma vez que as características biológicas de lectinas vegetais permitem que essas proteínas sejam utilizadas como ferramentas experimentais de valor em laboratórios de micologia, onde podem ser empregadas no estudo da estrutura fúngica, como marcadores patogênicos de espécies relacionadas, ou ainda para fins terapêuticos, diretamente ou em conjugação com outras drogas, atuando como mísseis biológicos.

Na perspectiva de explorar as potencialidades imunogênicas e adjuvantes da lectina glucose/ manose específica isolada de sementes de *Lablab purpureus* (L.) Sweet, este trabalho objetivou avaliar seus efeitos sobre a resposta imune humoral de camundongos e diante das evidências sobre a importância dos carboidratos da parede de fungos em processos patogênicos, associado às características antifúngicas de lectinas extraídas de sementes leguminosas, incluiu-se também a avaliação do efeito inibidor e marcador dessa lectina, sobre os fungos *Microsporium canis* e *Candida sp.*

Para tanto, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Purificar a fração ligante de ovalbumina a partir de sementes de *Lablab purpureus* (L) Sweet;
- Avaliar as atividades imunogênica e adjuvante de LLP sobre a resposta imune humoral de camundongos;

- Avaliar o efeito inibidor de monossacarídeos específicos sobre a atividade imunogênica e adjuvante de LLP na resposta imune humoral de camundongos;
- Avaliar comparativamente os efeitos antifúngico do extrato total e lectina de *L. purpureus* e da lectina de *Talisia esculenta* (TEL) sobre o crescimento de *Microsporium canis* e de *Candida sp.*;
- Verificar o efeito de resíduos de monossacarídeos na atividade antifúngica do extrato total e lectina de *L. purpureus* sobre o crescimento de *M. canis*;
- Avaliar o efeito marcador de LLP e de TEL conjugadas à FITC sobre artrosporos presentes em pelos parasitados e hifas e macronídios produzidos em cultura *in vitro* de *Microsporium canis*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

---

#### 3.1 Amostras Vegetais

Sementes de mangalô, *Lablab purpureus* (L.) Sweet, de cor branca (Figura 3), foram coletadas na localidade do Riacho da Guia, Estado da Bahia. A lectina de *Talisia esculenta* (St. Hil) Radlk foi cedida pelo Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB/UFMS) para ser utilizada nos ensaios antifúngicos.

#### 3.2 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, fêmeas, com idade entre 7 a 8 semanas e ratos Wistar albinos machos com 12 meses de idade, ambos provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Esses animais foram transferidos para o Laboratório de Experimentação Animal do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo menos 24 h antes dos experimentos, onde foram mantidos em colônia fechada sob condições de temperatura e umidade adequadas, com água e alimentação fornecidas *ad libitum* e iluminação diária de 12h.

#### 3.3 Amostras Microbianas

As amostras fúngicas utilizadas nesse experimento foram obtidas da micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) da Universidade Federal do Ceará, sendo as cepas de *Microsporum canis* originárias de animais portadores de dermatofitose e as de leveduras isoladas de pacientes humanos. Duas cepas ATCC foram incluídas nesse estudo: *Candida krusei* (ATCC 6258) e *C.*



*parapsilosis* (ATCC 22019). As amostras de pêlos infectados por *M. canis* obtidos de cães e gatos, foram cedidas pelo CEMM e pelo LABOVET de Fortaleza.

### **3.4 Análise Elementar da Farinha de *L. purpureus***

#### **3.4.1 Determinação do teor de umidade**

Amostras contendo 0,5g de farinha integral de sementes de *Lablab purpureus*, pesadas em recipientes secos e tarados, foram colocadas em estufa com circulação de ar forçada por 24 horas a  $105 \pm 5^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, os recipientes contendo as amostras foram transferidos para dessecador contendo sílica gel até atingirem a temperatura ambiente, sendo então pesados. Após a pesagem, os recipientes com as amostras retornaram a estufa e o processo foi repetido para verificação da constância do peso. O teor de umidade foi calculado para diferença entre o peso inicial e o peso final das amostras, expresso como percentagem do peso original.

#### **3.4.2 Determinação do Teor de Lipídios**

Os lipídios totais foram determinados por extração a quente com N-hexano (TRIEBOLD, 1946). Amostras contendo cerca de 2g de farinha integral das sementes de *L. purpureus* foram acondicionadas em cartuchos duplos de papel de filtro e colocadas no compartimento apropriado de extratores de Soxhlet acoplados a balões previamente desengordurados, secos e tarados. Em seguida, fez-se a adição do solvente e os conjuntos foram aquecidos por 8 horas contadas a partir do ponto de ebulição do hexano. Concluída a extração, o solvente foi parcialmente recuperado e os balões, contendo o componente lipídico das sementes e algum resíduo de solvente, foram levados para estufa a  $105 \pm 5^{\circ}\text{C}$ , por 12 horas. Passado o período de evaporação total do solvente, os balões foram transferidos para dessecador sem contato manual e, após atingirem a temperatura ambiente, foram pesados. O conteúdo lipídico foi calculado pela diferença entre o peso de cada



balão antes e depois do processo de extração e expresso como percentagem do peso seco das amostras.

### **3.4.3 Determinação das Cinzas**

O resíduo mineral das amostras foi determinado através da incineração, em mufla a 600°C por 4 horas, de amostras contendo 2g de farinha integral de sementes acondicionadas em cadinhos de porcelana e previamente limpos, secos e tarados. Decorrido o tempo de calcinação, os cadinhos foram transferidos para dessecador até atingirem a temperatura ambiente e pesados. O conteúdo de cinzas foi calculado através do quociente entre o peso final e o peso inicial das amostras, expresso em percentagem.

### **3.4.4 Determinação da Proteína Total**

O conteúdo protéico das amostras de farinha integral de sementes de *Lablab purpureus* foi determinado pelo método de Kjeldahl, adaptado para determinação do teor de nitrogênio através do método colorimétrico proposto por BAETHGEN & ALLEY (1989).

Amostras contendo 0,02g de farinha foram acondicionadas em tubos de mineralização juntamente com 1,5mL de ácido sulfúrico concentrado a 1,1g de mistura sólida composta de sulfato de potássio (acrescentado para aumentar o ponto de ebulição do ácido), selênio e sulfato de cobre (catalisadores, acondicionados 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 foi então diluída para 10 mL com água grau de Mili-Q e utilizada para o ensaio colorimétrico. O nitrogênio total foi estimado com base em curva padrão construída com solução de sulfato de amônio e a proteína bruta foi calculada através da multiplicação do teor de nitrogênio pelo fator 6,25.

### **3.4.5 Determinação da Fibra Bruta de Carboidratos**

O teor de fibra bruta foi determinado de acordo com a metodologia de Weende, conforme descrito por SILVA (1990). Amostras contendo 0,5g de farinha integral de sementes de mangalô foram depositadas em tubos apropriados para a digestão juntamente com 100mL de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1,25% e aquecidos por 30 minutos, contados a partir do ponto de ebulição. Concluída a digestão ácida, o material sólido foi filtrado com haste porosa, lavada com água destilada quente, adicionado de 100 mL de uma solução de NaOH a 1,35% e novamente aquecido por mais 30 minutos contados a partir da fervura. Concluída a digestão alcalina, o resíduo da hidrólise foi filtrado em cadinho poroso adaptado à boca de um kitasatu acoplado a uma bomba de vácuo. Com auxílio de pressão negativa, foi efetuada lavagem do resíduo sólido final com água destilada, em seguida com álcool etílico por duas vezes e finalmente, com éter etílico. Os cadinhos foram então colocados em estufa com circulação de ar forçada por 12 horas a 105 ± 5°C. ao fim desse período, os recipientes foram transferidos para dessecador e pesados. Tendo-se registrados os pesos dos resíduos das digestões sequenciadas, os cadinhos foram postos em mufla a 600°C por uma hora, resfriados em dessecador e, por último, novamente pesados. O valor correspondente à fibra bruta foi obtido pela diferença entre o peso do resíduo das digestões antes da calcinação e o resíduo mineral final, e o resultado foi expressado como percentagem do peso seco da farinha de sementes.

Os valores correspondentes à concentração de carboidratos não estruturais foram estimados por diferença.

### **3.5 Determinação da Atividade Hemaglutinante**

As atividades hemaglutinantes do extrato total e da lectina de *L. purpureus* LLP, bem como da lectina das sementes de *Talisia esculenta* (TEL) foram determinadas de acordo com a metodologia prescrita originalmente por MOREIRA E PERRONE (1977) e modificado por MOREIRA (1983). Para tanto, amostras de 1,0mL de sangue de coelho, foram colhidas e lavados 3 vezes com salina.



Alíquotas de 0,5mL foram padronizadas a 2% (v/v) e mantidas em banho de gelo, para que fosse resguardada a integridade das células.

Os testes de atividade hemaglutinante foram realizados em placas de microtitulação contendo 8 fileiras de 12 poços, que foram preenchidos com 50 $\mu$ L de salina 0,15M e em seguida por 50  $\mu$ L da amostra nos primeiros poços das fileiras. A amostra foi então diluída serialmente, com agitação e transferência de 50  $\mu$ L para o poço seguinte até o penúltimo poço da fila. Terminadas as diluições, foram adicionadas 50  $\mu$ L da suspensão de eritrócitos a 2% (v/v). As placas foram mantidas em repouso por aproximadamente uma hora à temperatura ambiente e em estufa a 37°C por 30min. O grau de aglutinação foi monitorado visualmente e a mínima concentração (ou maior diluição) que permitiu a visualização dos eritrócitos hemaglutinados foi determinado. Os poços que continham somente a suspensão de eritrócitos serviram como controle. Os resultados foram expressos como unidades de hemaglutinação (UH)g<sup>-1</sup> de farinha (atividade total) e HU mg<sup>-1</sup> de proteína (atividade específica), sendo uma UH correspondente ao valor recíproco da maior diluição capaz de provocar aglutinação visível a olho nu.

Os ensaios de hemaglutinação foram realizados durante o processo de purificação de LLP e durante todos os ensaios biológicos em que foram utilizadas essa lectina e a lectina de sementes de *Talisia esculenta* (TEL).

### **3.6 Dosagem de Proteínas Solúveis do Extrato total de *L. purpureus***

A dosagem de proteínas solúveis foi feita através do método de BRADFORD (1976), baseado na interação das proteínas da amostra com o reagente específico à base de Azul de Cromassie (G-250), com leitura espectrofotométrica feita a 595 nm. As concentrações de proteínas foram calculadas através de uma curva padrão obtida com albumina sérica bovina (BSA).

### **3.7 Obtenção da lectina glucose-manose ligante de sementes de *Lablab purpureus* (LLP)**

O processo de isolamento da lectina das sementes de *Lablab purpureus* SWEET com especificidade para glucose-manose foi desenvolvido conforme descreveu Mo *et al.* (1999).

#### **3.7.1 Preparação da Farinha**

Após remoção manual das cascas das sementes, estas foram trituradas em liquidificador e em seguida submetidas a moagem fina em moinho rotatório para café (marca WILEY). Com o objetivo de obter um pó fino, a farinha foi novamente moída em liquidificador da marca WALITA. 20g da farinha de fina granulação foi delipidada com uma mistura de cloreto de metileno e metanol (2:1, v/v) e deixada em repouso à temperatura ambiente por duas horas. A suspensão obtida foi filtrada em funil de *buchner* e seca à temperatura ambiente. A farinha seca e delipidada foi armazenada em frascos hermeticamente fechados e mantidas à -10°C para posterior utilização.

#### **3.7.2 Preparação do Extrato Total**

A farinha de semente, seca e delipidada, foi suspensa em tampão fosfato de potássio pH 7,4, contendo NaCl 0,15M (PBS) na proporção de 1:10 (p:v). A suspensão resultante foi submetida à leve agitação contínua durante 18 horas ("over night") a 4°C. Após esse período, a suspensão foi centrifugada a 7.000 g por 45 min a 4°C em centrífuga SORVALL RC-5B. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante, chamado de extrato total (ET), foi em seguida filtrado, liofilizado e acondicionado em frasco limpo a 4°C (Figura 3.2).

#### **3.7.3 Preparação da Fração Precipitada com Sulfato de Amônio**

Com a finalidade de se obter uma fração mais rica em lectina, parte do extrato total foi precipitado com sulfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ). Decorridos 4



horas de repouso, tempo necessário para a precipitação de proteínas, o precipitado formado entre 20 e 60% de saturação do  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  foi coletado e dialisado exaustivamente contra 0,001 M de PBS, pH 7,4, contendo 1mM  $\text{CaCl}_2$ . Para remover as moléculas insolúveis, a amostra foi centrifugada a 7.000 g por 45 minutos a 4°C em centrífuga SORVALL RC-5B e o precipitado descartado. O dialisado resultante foi liofilizado e utilizado na coluna de ovalbumina-Sepharose.

#### **3.7.4 Cromatografia de Afinidade**

80mg da fração 30-60%, obtido conforme descrito no ítem acima, foi aplicada na coluna de ovalbumina-sepharose previamente equilibrada com tampão fosfato 0,1M ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), com NaCl 0,1M, pH 7,6. Sob fluxo de 40ml/hora, foram coletadas alíquotas de 3,0 mL/tubo. O primeiro pico foi eluído com o tampão de equilíbrio. Em seguida, foi aplicado solução de HCl 0,1M para eluição da lectina. Com o intuito de evitar alterações bruscas de pH para a lectina, antes dessa ser eluída, aos tubos coletores vazios foram adicionadas duas gotas de NaOH 2N. Em seguida o pico eluído da lectina, monitorado através de leitura espectrofotométrica a 280nm, foi imediatamente dialisado e liofilizado.

#### **3.8 Eletroforese da Lectina de *Lablab purpureus***

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada em condições desnaturantes, conforme a metodologia preconizada por Laemmli (1970) e teve como finalidade confirmar o grau de pureza da lectina.

As amostras protéicas foram preparadas utilizando-se 10 $\mu$ L de uma solução estoque em microtubos contendo 1mg de proteína homogeneizada em 1ml de tampão da amostra (Tris-HCl 0,5M pH 6,8; SDS 10% (p/v); glicerol 20% (v/v);  $\beta$ -mercaptoetanol 4% (v/v) e azul de Bromofenol 2% (p/v) seguido de aquecimento a 100°C durante 2 minutos. Alíquotas de 20 $\mu$ L dessas soluções, correspondendo a 20  $\mu$ g de proteína, foram aplicadas nos géis de poliacrilamida.

Como padrão de massa molecular foram utilizados: albumina de soro bovino (BSA) com 66 kDa, ovalbumina, 45 kDa, inibidor de tripsina, 20,1 kDa e  $\alpha$ Lactalbumina, 14,2 kDa.

A eletroforese transcorreu, à temperatura ambiente de 25°C, à 150 volts, em gel vertical de 3,5mm de espessura, composto por um gel de aplicação (5,0% de acrilamida e 1,0% de SDS em tampão Tris-HCL 1,0M pH 6,8) e um gel de separação (15% de acrilamida e 1% de SDS em tampão Tris-HCL 1,5M, pH 8,8).

Para a visualização das bandas, o gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*, 40% de metanol, 10% de ácido acético e água destilada durante 15 minutos. O descoramento do gel foi realizado com uma solução contendo 7% de ácido acético, 30% de metanol e água destilada. Alternativamente, foi empregada a técnica de revelação pela prata (BLUM *et al.*, 1987).

### **3.9 Ensaio Biológicos**

#### **3.9.1 Atividades Imunogênica, Adjuvante e Inflamatória da Lectina de *Lablab purpureus***

##### **3.9.1.1 Protocolo de Imunização**

Grupos de cinco camundongos foram imunizados subcutaneamente na região dorsal com 200 $\mu$ l contendo uma das seguintes amostras:

- 50 e 100 $\mu$ g de LLP em PBS;
- 10 $\mu$ g de ovalbumina (SIGMA) dissolvida em PBS pH 7,3, conforme metodologia descrita por DANTAS *et al.* (2000);
- 10 $\mu$ g de OVA dissolvida em PBS pH 7,3 contendo 1mg de Al(OH)<sub>3</sub>, conforme metodologia descrita por SILVA (2004);
- 10 $\mu$ g de OVA dissolvida em PBS contendo 50 e 100 $\mu$ g de LLP;
- 50 $\mu$ g de LLP dissolvida em PBS contendo D-glucose/ D-manose 0,1M, cada, submetida a incubação à 37°C durante 60 minutos antes da inoculação;



- 50µg de LLP dissolvida em PBS contendo N-acetil-D-glucosamina 0,1M, submetida a incubação à 37°C durante 60 minutos antes da inoculação;
- 10µg de OVA dissolvida em PBS contendo 50µg de LLP conjugada aos açúcares D-glucose/ D-manose 0,1M, cada, submetida a incubação à 37°C durante 60 minutos antes da inoculação;
- 10µg de OVA dissolvida em PBS contendo 50µg de LLP conjugada ao açúcar N-acetil-D-glucosamina 0,1M, submetida a incubação à 37°C durante 60 minutos antes da inoculação;
- Todas as amostras contendo lectina foram previamente submetidas à ensaios de hemaglutinação, conforme descrito previamente, a fim de avaliar a atividade biológica da lectina;
- Solução de salina tamponada com fosfato (PBS).

As camundongas receberam reforço 14 dias depois da primeira imunização, sendo as coletas dos de soros realizadas antes da primeira dose (dia 0) e no 7°, 14°, 21°, 35° e 42° dias depois. As amostras de sangue foram obtidas por punção do plexo retro-orbital, utilizando pipetas *Pasteur*. Cada amostra coletada foi deixada em repouso durante uma hora à temperatura ambiente, para retração do coágulo. Após esse procedimento, para tornar o soro resultante livre de hemácias, o mesmo foi recolhido e submetido a centrifugação. Em seguida, o soro foi armazenado a -20°C.

### **3.9.1.2 Avaliação do Efeito Adjuvante e Antigênico de LLP na Síntese de de Imunoglobulinas (IgG, IgM e IgA) Determinados por ELISA**

A presença de anticorpos que reagem com OVA, LLP ou LLP associada a carboidratos, nos soros de cada grupo experimental foi avaliada através do ensaio imunoenzimático indireto *enzyme linked immunosorbent assay* -ELISA, seguindo a metodologia descrita por VERDOLIN *et al.*(2001).

A sensibilização das placas de microtitulação para ELISA foi feita através de incubação por 18 horas à temperatura de 4°C com soluções de PBS contendo 0,4µg/poço de uma das seguintes amostras: OVA, LLP ou LLP diluído em

soluções 0,1M dos açúcares (D-glucose/ D-manose e N-acetil-D-glucosamina). Após o período de aderência dos antígenos, foi feita lavagem dos poços (5 vezes) com tampão PBS-*Tween* 20 (0,05%). As placas foram bloqueadas com solução de PBS-Molico a 5% e incubadas por uma hora à temperatura de 37°C. Após nova lavagem, foram adicionadas 5 diluições seriadas dos soros-teste, partindo de 1:638, em solução bloqueadora. Além dos soros-teste, as placas foram preenchidas com soro negativo, solução bloqueadora e soro de título previamente determinado; e incubadas à 37°C durante duas horas. As imunoglobulinas não ligadas foram lavadas com PBS-*Tween* e logo depois, adicionado anticorpos polivalentes monoclonais conjugados à peroxidase (Dako N°.P 260. DK-2600 Glostrup Denmark), que foram utilizados na diluição de 1: 1000. As placas foram novamente incubadas por uma hora a 37°C e após outras lavagens, a reação enzimática foi detectada pela adição de orthophenylenediamine (OPD) seguido de incubação em câmara escura à temperatura ambiente de 26°C por 30min. A reação foi bloqueada com a adição de 20µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5N e sua intensidade foi avaliada através de leitura espectrofotométrica em um comprimento de onda de 492nm com um MICRO ELISA LABSYSTEMS MULTISKAM MS.

Os isótipos de anticorpos induzidos por LLP e OVA foram avaliados utilizando-se anticorpos monoclonais específicos para IgG, IgM e IgA de camundongos (Dako N°.P 260. DK-2600 Glostrup Denmark).

Os resultados foram expressos como a soma das absorbâncias obtidas a partir das diluições seriadas de cada soro. Cada valor foi multiplicado por 1.000 e os valores obtidos foram denominados ELISA\* (escore de elisa) e assim utilizados para análise estatística ( VERDOLIN *et al.*,2001).

### **3.9.1.3 Avaliação do Efeito Adjuvante na Síntese de IgE Específica Determinada por PCA**

Nesse ensaio foi empregada a técnica de anafilaxia cutânea passiva desenvolvida originalmente por Ovary (1952) e com modificações propostas por MOTA & WONG (1969).



De posse dos anti-soros de camundongos imunizados com preparações de LLP conjugada a OVA descritas no ítem anterior, a determinação dos títulos de IgE que reagiram com OVA foi realizada em ratos adultos machos, que inicialmente foram sensibilizados via intra-dérmica com os soros-teste. Para isso, esses animais foram anestesiados com éter e tricotomizados na pele da região dorsal, onde cada soro (diluído serialmente em NaCl 0,15M) foi injetado em um ponto previamente marcado na pele. Após 18 horas, a reação foi desencadeada através da injeção intrapeniana com solução de azul de Evans contendo o antígeno específico, OVA ou LLP, na concentração de  $1\text{mg/mL}^{-1}$  por animal. Passados 30 minutos de reação, os animais foram sacrificados com halotano e suas peles dessecadas e delipidadas para posterior leitura das lesões no tecido subcutâneo, provocadas pelo extravasamento do corante azulado, nos locais das aplicações dos soros.

A partir dessas observações, os títulos de IgE foram analisados comparando com controle de títulos conhecidos. Os valores foram estimados como logaritmo na base 2 do inverso da diluição máxima ( $D_{\text{máx}}$ ) capaz de provocar uma reação cutânea positiva. Cada teste foi realizado em duplicata.

### **3.9.2 Avaliação dos Efeitos de LLP sobre *M. canis* e *Candida sp.***

#### **3.9.2.1 Ensaio de inibição do crescimento fúngico pelo método de microdiluição em Caldo**

##### **3.9.2.1.1 *Microsporium canis***

Esse ensaio foi adaptado da metodologia recomendada pelo documento M8-P do *National Committee for Clinical Laboratory Standards –NCCLS* (1998) para testes de susceptibilidade de fungos filamentosos (FERNANDEZ-TORRES *et al.*, 2002; PUJOL *et al.*, 2002). A padronização do método considera a temperatura de  $35^{\circ}\text{C}$  durante 4 dias de incubação, o inóculo consistindo de  $10^3$  conídios/ mL e o meio RPMI 1640 com L-glutamina, ajustado à pH 7 com ácido morfolino-

propanesulfônico (MOPS) 0,16 mM. Nesse meio, a acidez resultante do metabolismo fúngico é revelada através da mudança da cor rosa para amarelo.

Com a finalidade de avaliar o efeito de lectinas sobre o crescimento do *Microsporium canis* foram utilizadas LLP e TEL (lectina de *Talisia esculenta*), além do extrato total de sementes de *L. purpureus* (ET-LLP). Alíquotas liofilizadas de cada uma dessas amostras foram inicialmente dissolvidas em PBS pH 7,3 a fim de obter uma solução estoque contendo 2mg/mL de lectina. Essa solução foi esterilizada em filtro de membrana de 0,22µm de poro (Millex-GP, Millipore) e diluída serialmente encerrando as seguintes concentrações: 1; 0,5; 0,25; 0,12; 0,06; 0,03 e 0,015mg/mL.

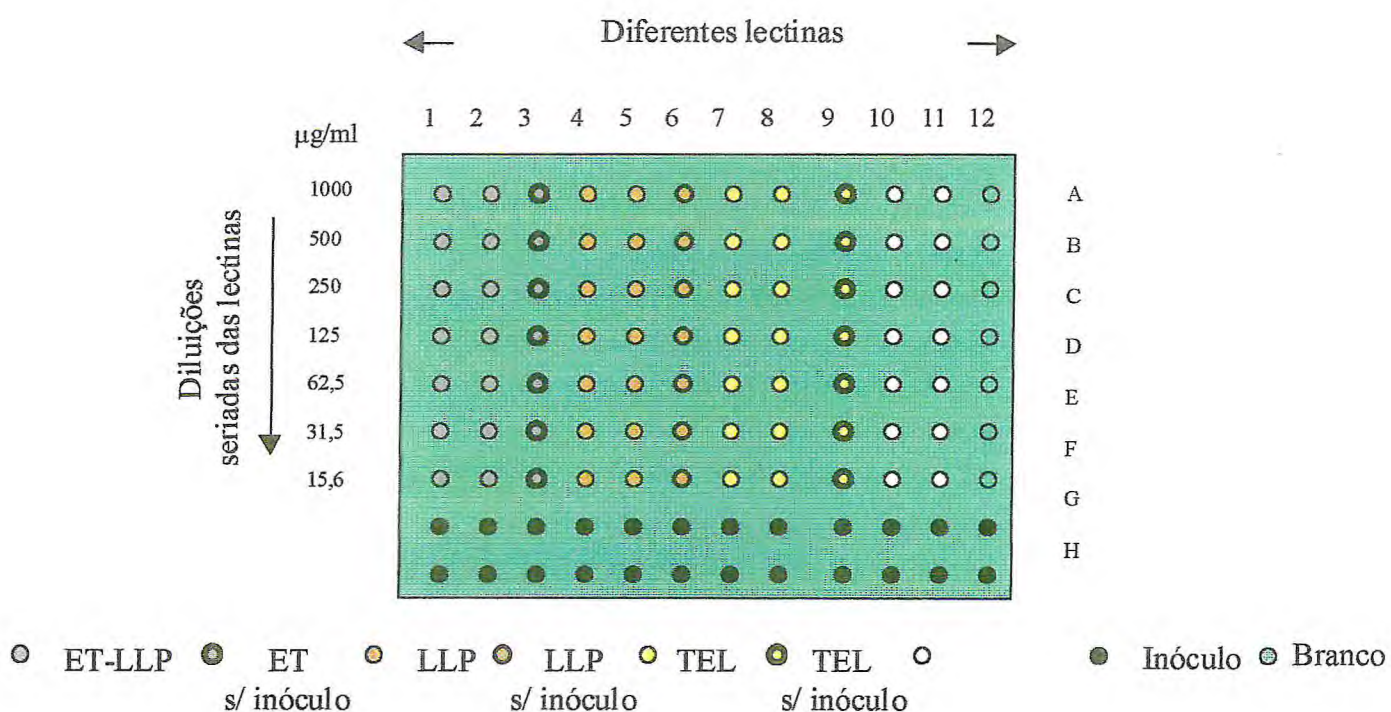
Para a confecção do inóculo, cepas de dermatófitos, provenientes de amostras armazenadas no CEMM, foram repicadas em ágar batata e subcultivadas por 5 a 10 dias, à temperatura ambiente, até a observação de colônias que revelassem, à microscopia óptica, macroconídios característicos de *M. canis*. Sob tais condições, os tubos contendo culturas selecionadas (20 cepas de *M. canis*, em triplicatas) foram adicionados com 2mL de PBS pH 7,3 e submetidos à leve agitação até obtenção de suspensão homogênea, que foi ajustada, através de leitura espectrofotométrica à 530nm, à transmitância de 70%, correspondente à  $10^3$  conídios/mL<sup>-1</sup>, segundo PUJOL *et al.*(2002). Dessa suspensão, alíquotas de 100µL foram dissolvidas em igual volume de solução de PBS pH 7,3 contendo ou não as diferentes concentrações de lectina. Essas amostras foram pré-incubadas durante 60 minutos em temperatura de 37°C para em seguida, serem inoculadas nos poços da placa de microtitulação.

Foram examinados os efeitos de haptenos específicos de LLP, ou seja, dos açúcares D-glucose; D-manose e N-acetil-D-Glucosamina. Cada monossacarídeo, na concentração 0,1M, foi previamente incubado, durante 60 minutos à 37°C, com solução de PBS pH 7,3 contendo 1mg de LLP ou de ET-LLP. Os inóculos também foram testados frente a diluições contendo apenas o carboidrato.

Conforme ilustrado na Figura 2, esse ensaio foi realizado em placas plásticas esterilizadas de fundo chato, onde em cada poço, já preenchido com



100µl de meio de cultura, foram dispensadas as diferentes diluições das amostras-teste (inóculo-lectina). Duplas de fileiras de poços foram resguardadas para controle da pureza do meio, do inóculo e das soluções de lectinas. O crescimento fúngico, sob incubação à 35°C, foi determinado visualmente pela mudança de cor do meio durante os dias 1,2, 3, 4 e 5. O monitoramento desses resultados foi feito através de subcultivo em ágar Sabouraud. Todos os procedimentos foram executados assepticamente, em câmara de fluxo laminar de nível de segurança II e os ensaios realizados em triplicatas.



**Figura 2.** Ensaio de inibição de crescimento fúngico em placas de microdiluição. Os ensaios, utilizando LLP, ET e TEL, foram realizados em duplicatas, resguardando uma 3ª fileira para a diluição da lectina sem o inóculo. O inóculo sem as amostras testadas, bem como o RPMI 1640 puro foram depositados nas fileiras G-H e 10-11, respectivamente. A fileira 12, não preenchida, foi utilizada para medir a absorbância do vazio da placa.

Os resultados de cada experimento foram expressos como percentual de crescimento sobre as vinte cepas de *M. canis* estudadas, e assim utilizados para análise estatística.

#### **3.9.2.1.2 *Candida sp.***

Nesse trabalho, foram usadas 6 cepas de diferentes espécies de *Candida* provenientes da micoteca do CEMM. As seguintes espécies foram estudadas: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*. Duas cepas de referência foram incluídas: *C. krusei* ATTC 12344 e *C. parapsilosis* ATCC 1345.

O ensaio de susceptibilidade com as espécies de *Candida* foi desenvolvido conforme Documento M27-A NCCLS, cuja metodologia foi semelhante à descrita no ítem anterior. Na preparação do inóculo, as amostras estudadas, obtidas em ágar Sabouraud, foram repicadas, em triplicatas, no mesmo meio e incubadas, à 35°C, por 24 à 48 horas. À evidência da pureza do crescimento das leveduras, fragmentos das colônias foram dissolvidos em água deionizada, esterilizada, e a transmitância foi ajustada para 90% em comprimento de onda de 530nm. para obter, ao final do experimento inóculo correspondente à 0,5 a 2,5 X 10<sup>3</sup> UFC/ml (POSTERARO *et al.*,2000).

#### **3.9.2.2 Ensaio de inibição do crescimento do *Microsporum canis* à partir de Pêlos obtidos de Cães e Gatos Portadores de Dermatofitose**

Neste ensaio, foi avaliado o efeito da LLP e do ET-LLP sobre o crescimento de *M. canis* a partir de pêlos, que segundo diagnóstico micológico, apresentassem artrosporos de *Microsporum canis*. Dessa maneira, em placas de cultura de células, alíquotas de cada uma das 15 amostras de pêlos, oriundos de animais diferentes, foram imersas em soluções de PBS pH 7,6, puro e contendo 500µg/mL de lectina. Após pré- incubação por 60 minutos à 37°C, os pêlos foram retirados dessas soluções e inoculados em tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud. O



crescimento, à temperatura ambiente, foi monitorado durante 21 dias até que fosse evidenciado o crescimento de colônias com características macro e micromorfológicas de *M. canis*.

### **3.9.2.3 Marcação de Lectinas com Isotiocianato-5 -Fluoresceína (FITC)**

A marcação da lectina de *L. pupureus* (LLP) com isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi realizada conforme metodologia descrita por PINTO *et al.*, (2001).

Alíquotas contendo 1mg de LLP associada ao monossacarídeo inibidor, foram dissolvidas em 2mL de uma solução de conjugação, a qual consistiu de 1,5mL de tampão carbonato de sódio 0,1M e bicarbonato de sódio 0,1M; pH 9,3 e 0,5mL de etilenoglicol. Essa suspensão foi submetida a agitação em VORTEX e logo em seguida, foi adicionada com 500 $\mu$ L de uma solução de FITC (0,05mg em etilenoglicol). A mistura obtida foi então submetida a nova agitação em por 5h, à 4°C, ao abrigo da luz. Após essa incubação, a fração contendo lectina/FITC foi separada da FITC não conjugada por meio de cromatografia de exclusão molecular, em coluna PD 10 (PHARMACIA LKB-9,0ml). A coluna foi previamente equilibrada com água de Milli Q, saturada com N-butanol 5%, aplicada em 3 vezes o seu volume (3X9,0). O fluxo contínuo da coluna foi mantido por força da gravidade. Imediatamente antes da cromatografia, 450 $\mu$ L dessa solução de equilíbrio foi também adicionada à suspensão de lectina e FITC para logo em seguida ser aplicada na coluna. O pico I, correspondente à fração lectina/FITC foi retirado com 3,5mL de solução N-butanol 5%, enquanto que a FITC não conjugada foi eluída no pico II, com 10 ml da mesma solução.

### **3.9.2.4 Análise do Efeito da Lectina-FITC sobre Dermatófitos e Leveduras**

Com base em metodologia descrita por MARES *et al.* (2002), as lectinas marcadas foram empregadas a uma concentração de 100 $\mu$ g/mL. Dessa maneira, 10 $\mu$ l de cada lectina marcada com FITC foram dissolvidas em 90 $\mu$ l do inóculo

fúngico, cuja preparação foi descrita anteriormente. Amostras do inóculo sem lectina foram utilizadas como controle. Todas as preparações foram incubadas à temperatura ambiente em câmara escura, sob agitação constante, por duas horas. Após esse período, cada suspensão foi submetida à centrifugação 3.000 g, por cinco minutos. Descartado o sobrenadante, o precipitado foi homogeneizado em 50 $\mu$ L de PBS pH 7,4. Sempre à proteção da luz, preparações dessas suspensões em lâmina-lamínula foram analisadas ao microscópio de fluorescência.

### **3.10 Análise Estatística**

Inicialmente, todos os dados obtidos foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnoff (SAS, 1997), para confirmar se as variáveis respostas a serem analisadas apresentavam uma distribuição normal e aos testes de Levene e Bartlett, para confirmação da homogeneidade de variância entre os tratamentos. Subsequentemente, as variáveis que não apresentaram homocedastidade foram submetidos à análise não paramétrica de Krukal Wallis. Os dados que apresentaram homogeneidade de variância foram submetidos ao teste de Duncan utilizando-se também o programa estatístico SAS (2000).





Figura 3. Sementes e vagens de *Lablab purpureus* (L) Sweet



## 4 RESULTADOS

---

### 4.1 Análise Elementar da Farinha de *Lablab purpureus*

As condições químicas apresentadas pela farinha das sementes de *Lablab purpureus* (L.) SWEET (Figura 3), das quais a lectina de interesse foi obtida estão apresentadas na Tabela 2.

**TABELA 2. Composição centesimal de sementes maduras de *L. purpureus***

	Valores (percentuais)
Umidade total	8,35
Matéria seca total	91,65
Proteína bruta	26,75
Extrato etéreo	0,92
Fibra em detergente neutro	31,01
Fibra em detergente ácido	4,68
Resíduo mineral	4,20

#### 4.2 Cromatografia de Afinidade da Lectina de *Lablab purpureus*

Amostras de 80 mg de extrato bruto liofilizado foram solubilizados em tampão fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) com  $\text{NaCl}$  0,1 M pH 7,6 0,1M e aplicadas em coluna ovalbumina-Sepharose 4B. A eluição foi feita com o mesmo tampão coletando-se 3 mL por tubo, com um fluxo de 40mL por hora. A atividade hemaglutinante foi detectada nas frações eluídas com  $\text{HCl}$  0,1M de número 18 a 24 (Figura 4).

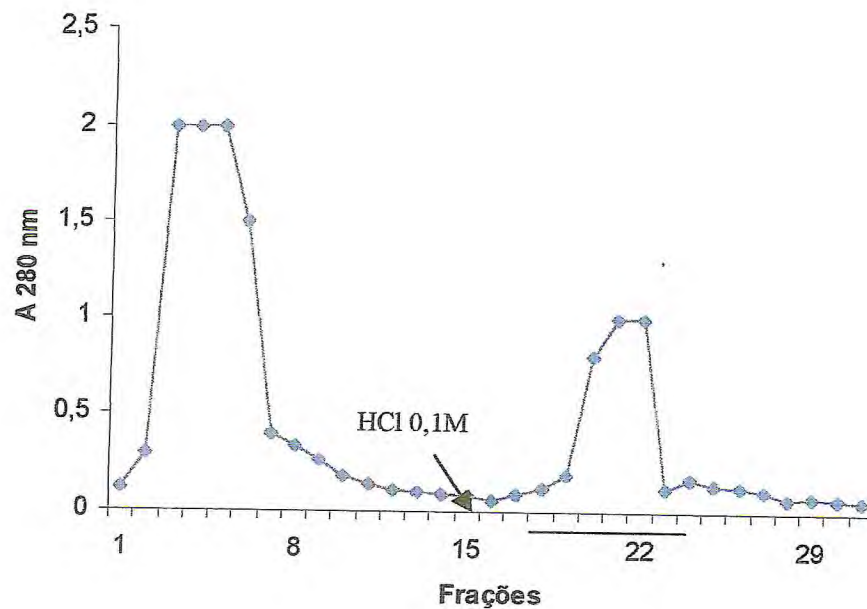
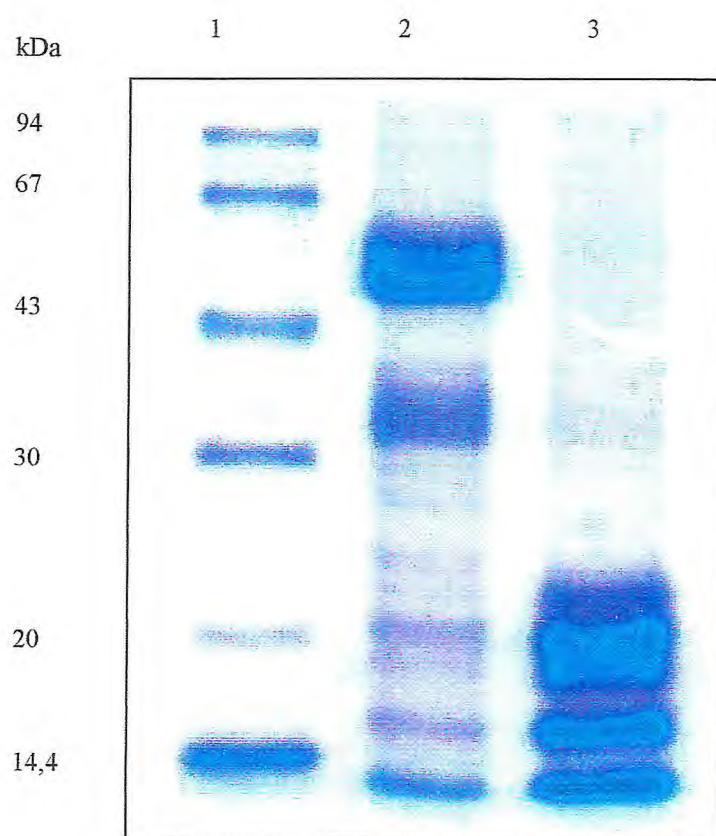


Figura 4. Cromatografia de afinidade em coluna de ovalbumina-Sepharose 4B (1,0x17 cm, vol. 15mL) da lectina de sementes de *Lablab purpureus*. A lectina adsorvida foi eluída com  $\text{HCl}$  0,1M. ( \_\_\_\_\_ ) atividade hemaglutinante do pico II

#### 4.3 Eletroforese da lectina de *Lablab purpureus* (L) Sweet (LLP)

Como mostrado na Figura 5, a lectina apresenta cinco bandas protéicas com massa molecular aparente variando entre 10 a 22kDa, tal como relatou MO *et al.*, (1999).



**Figura 5.** Eletroforese de LLP em gel de poliacrilamida 12,5% com SDS. (1) Padrões de peso molecular; (2) pico I da coluna de afinidade; (3) fração purificada de LLP.



#### 4.4 Inibição da Atividade Hemaglutinante

A Tabela 3 mostra a menor concentração do açúcar capaz de inibir 50% da atividade hemaglutinante (CI<sub>50%</sub>) do extrato protéico total (ET) e da fração purificada da lectina de *Lablab purpureus* (LLP). Os açúcares que melhor inibiram a atividade hemaglutinante de ET, em ordem de intensidade, foram N-acetil – D-glucosamina, D-manose, D-glucose e D-galactose. Já com relação à LLP, o melhor inibidor foi D-manose, seguido de N-acetil – D-glucosamina e D-glucose.

**TABELA 3. Inibição da atividade hemaglutinante do extrato total (ET) e da fração purificada da lectina (LLP)**

Açúcar	ET IC <sub>50%</sub> (mM)	LLP
N-acetil-D-glucosamina	7,8	7,8
D-glucose	15,6	7,8
D-manose	7,8	3,9
D-galactose	31,2	*

IC<sub>50%</sub>: menor concentração requerida do açúcar para inibir 50% da atividade hemaglutinante do ET e da fração purificada da lectina.

## **4.5 Ensaios Biológicos**

### **4.5.1 Atividades Imunogênica e Adjuvante de LLP**

#### **4.5.1.1 Avaliação do Efeito Imunogênico**

##### **4.5.1.1.1 Síntese de Anticorpos Específicos Induzidos por Diferentes Doses de LLP**

Os dados representados na Figura 6 (Tabela 4) mostram que LLP, nas doses de 50 ou 100µg, induziu em camundongos resposta humoral específica. A cinética da evolução da síntese de imunoglobulinas contra LLP mostrou que somente a partir da dose de reforço (14 dias), os anticorpos específicos alcançaram níveis significativamente elevados. Esses títulos persistiram até a 4ª semana de imunização (35 dias), mas regrediram de forma acentuada com 42 dias, mesmo ainda apresentando níveis expressivos quando foram comparados àqueles produzidos contra OVA.

##### **4.5.1.1.2 Síntese de Anticorpos Específicos Induzidos por LLP Conjugada aos Carboidratos D-glucose/ D-manose e N-acetil- D-glucosamina**

A avaliação dos anticorpos específicos de animais imunizados com LLP conjugada a monossacarídeos mostrou que não existiu diferença significativa entre os efeitos de D-manose/ D-Glucose e N-acetil-D-glucosamina. Conforme mostra a Figura 7 (Tabela 5) a cinética da síntese de anticorpos anti-LLP induzida pelos conjugados carboidrato-lectina foi caracterizada por baixos níveis de anticorpos e alterações significativas em diversos pontos, sobretudo na resposta secundária.

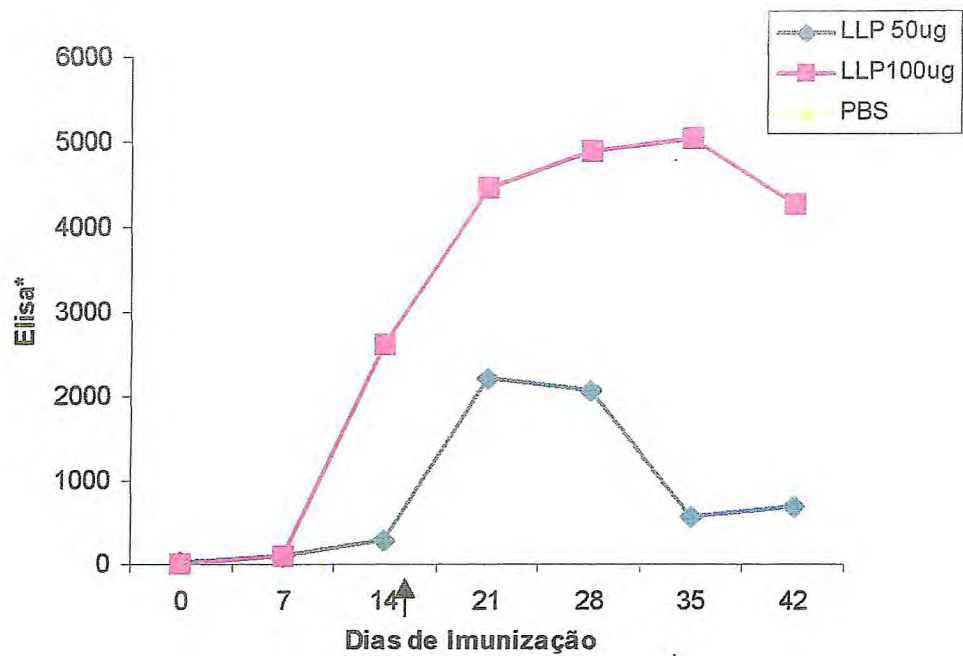


Figura 6. Cinética da síntese de anticorpos específicos, determinados por ELISA, em camundongos imunizados com diferentes doses de LLP: 50 e 100 µg/animal. Cada ponto corresponde à média dos escores de Elisa\* obtidos de cinco animais e são representativos de dois experimentos independentes. Os valores que deram origem ao gráfico, bem como o grau de significância entre eles está mostrado na Tabela 4. → indica o dia de inoculação da dose de reforço



**TABELA 4. Cinética da síntese de anticorpos específicos produzidos por camundongos inoculados com diferentes doses da lectina de *Lablab purpureus***

Tratamentos	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
50µg/dose	16,8 <sub>±</sub> 6,2cE	84,4 <sub>±</sub> 71,9bC	283 <sub>±</sub> 127aC	2198 <sub>±</sub> 601bA	2073 <sub>±</sub> 973bA	569 <sub>±</sub> 117bBC	680 <sub>±</sub> 121bC
100µg/dose	9,2 <sub>±</sub> 3,27bC	89 <sub>±</sub> 76 <sup>a</sup> bB	2606 <sub>±</sub> 370aB	4470 <sub>±</sub> 396aA	4888 <sub>±</sub> 190aA	5037 <sub>±</sub> 316aA	4264 <sub>±</sub> 392aA
PBS	20 <sub>±</sub> 12abA	20 <sub>±</sub> 8cA	18 <sub>±</sub> 7cA	25 <sub>±</sub> 10cA	21 <sub>±</sub> 13cA	16 <sub>±</sub> 9cA	18 <sub>±</sub> 12cA

Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre linhas (comparação dos diferentes tratamentos dentro de cada dia) pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre colunas (evolução da resposta a cada tratamento ao longo dos dias) pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

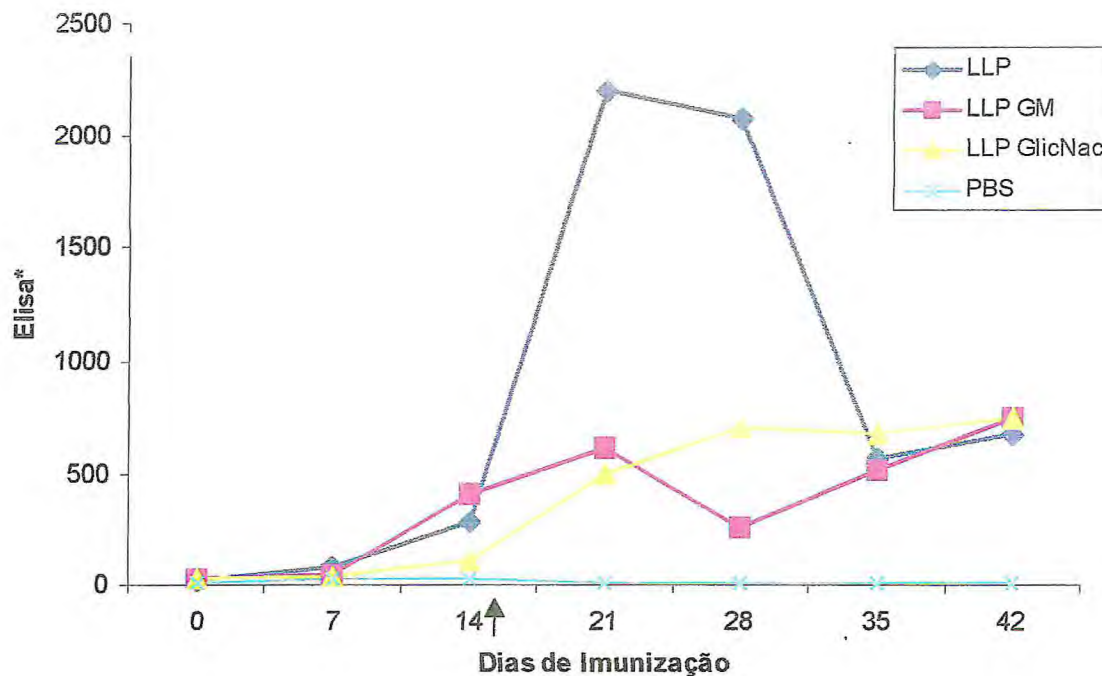


Figura 7. Cinética da síntese de anticorpos específicos, determinada por ELISA, em camundongos imunizados por via subcutânea com LLP pura ou conjugada a diferentes carboidratos. Cada ponto corresponde à média dos escores de Elisa\* obtidos de cinco animais e são representativos de dois experimentos independentes. Os valores que deram origem ao gráfico, bem como o grau de significância entre eles está mostrado na Tabela 5. → indica o dia de inoculação da dose de reforço

**TABELA 5** Cinética da síntese de anticorpos específicos produzidos por camundongos inoculados com solução de LLP pura ou conjugada aos monossacarídeo: N-acetil- D- glucosamina, D- glucose e D- manose

Tratamentos	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
LLP	16±6 <sup>a</sup> bE	84±71AbD	283±127abC	2198±601aA	2073±973aA	569±117aB	680±121AbB
LLP-Glu/Man	24±11aD	39±19BcD	108±46cC	500±303bB	698±541bB	1233±619aA	1036±311aA
LLP-GluNac	30±15aC	48±14bC	409±104aA	615±57bA	259±180cB	516±253bA	747±651bA
PBS	20±12abA	20±8cA	18±7cA	25±10cA	21±13eA	16±9eA	18±12eA

Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre linhas (comparação dos diferentes tratamentos dentro de cada dia) pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre colunas (evolução da resposta a cada tratamento ao longo dos dias) pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

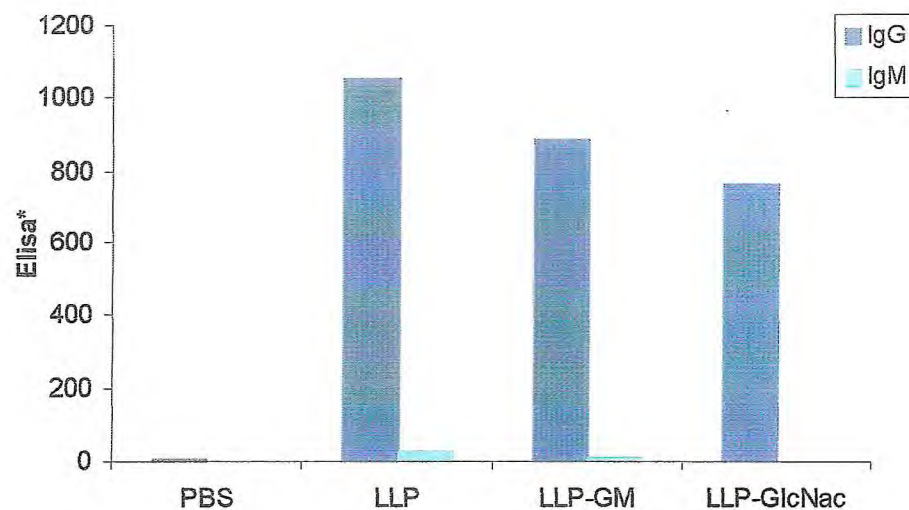


#### **4.5.1.1.3 Padrão Isotípico da Resposta Secundária de 28 dias Induzida por LLP Conjugada aos Carboidratos D-manose/ D-Glucose e N-acetil-D-glucosamina**

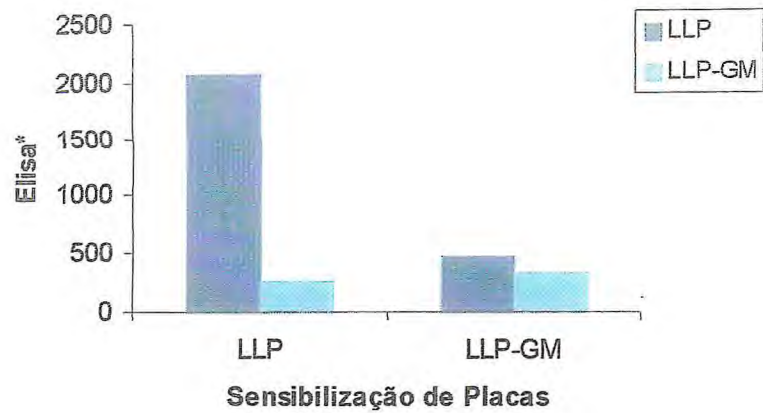
Os resultados apresentados na Figura 8 mostram que LLP induziu na resposta secundária (28 dias) síntese de anticorpos específicos com predominância de IgG. Os açúcares conjugados à LLP não interferiram com a síntese dessa classe de anticorpos, mas inibiram significativamente a produção de IgM.

#### **4.5.1.1.4 Detecção de Anticorpos Específicos para LLP na Resposta Secundária (28 dias) Através da Sensibilização da Placa para ELISA com LLP conjugada aos Carboidratos D-manose/ D-Glucose e N-acetil-D-glucosamina .**

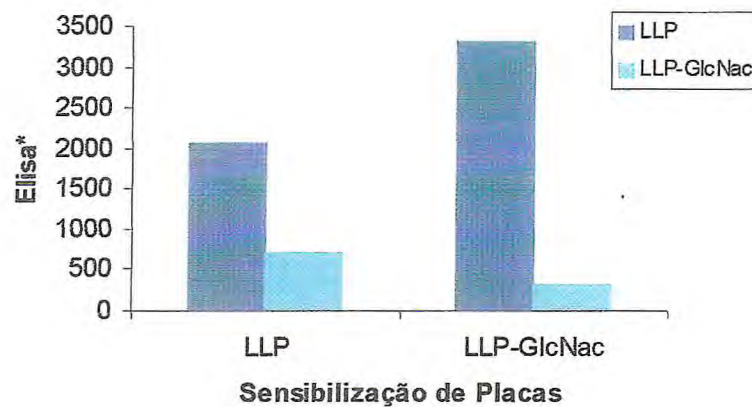
A análise de anticorpos específicos induzidos em animais imunizados com LLP, na forma pura e associada a carboidratos, foi realizada em placas sensibilizadas com LLP (4 $\mu$ g/ poço) diluída em solução salina de açúcares 0,1M. Esses resultados foram comparados com aqueles obtidos da análise utilizando placa sensibilizada com solução de LLP pura. A figura 9 mostra que a placa incubada com a lectina conjugada a D-glucose/ D-manose subestima significativamente a magnitude dos níveis séricos de anticorpos anti-LLP. No entanto, quando o carboidrato testado é GlcNac os títulos de anticorpos específicos são equiparáveis aos detectados em placa sensibilizada com solução pura de LLP.



**Figura 8.** Padrão isotípico de anticorpos específicos, determinado por ELISA, produzido na resposta secundária (28 dias) pela imunização subcutânea com solução contendo 50 µg de LLP pura e conjugada a diferentes carboidratos (0,1M). Cada ponto corresponde à média dos escores de Elisa\* obtidos de cinco animais representa dois experimentos independentes. Os valores que deram origem ao gráfico, bem como o grau de significância entre eles está mostrado na Tabela 6.



(A)



(B)

Figura 9. Síntese de anticorpos específicos para LLP na resposta secundária (28 dias), determinado por ELISA em placa sensibilizada com solução de LLP (0,4 µg/poço) pura e conjugada a diferentes carboidratos; (A) D-glucose/ D-manose; (B) N-acetil- D-glucosamina. Cada ponto corresponde à média dos escores de Elisa\* obtidos de cinco animais e representam dois experimentos independentes. Os valores que deram origem ao gráfico, bem como o grau de significância entre eles está mostrado na Tabela 7.



**TABELA 6. Padrão isotípico da síntese de imunoglobulinas anti-LLP na resposta secundária (28 dias)**

Imunoglobulinas	LLP	LLP-GlcNAc	LLP-Glu/Man	PBS
IgG	05268±390a	1414±449 <sup>a</sup>	1236±434a	21±24b
IgM	142±133a	18±5b	20±12b	11±6b

Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos na síntese de IgG pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre os tratamentos na síntese de IgM (comparação entre classes dentro do tratamento) pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

**TABELA 7 Síntese do anticorpos específicos para LLP na resposta secundária (28 dias), determinado por ELISA em placa sensibilizada com solução de LLP (0,4 µg/poço) pura e conjugada a diferentes carboidratos; (A) D-glucose/ D-manose; (B) N-acetil- D-glucosamina**

Soros	LLP	LLP-Glu/Man	LLP-GlcNAc
Sensibilização da Placa			
LLP	2073±973a	698±541 <sup>a</sup>	259±180
LLP-Glu/Man	465±91,3b	337,2±283,2b	*
LLP-GlcNAc	3299±254 <sup>a</sup>	*	306,4±207,8

Letras distintas representam diferenças significativas entre linhas (comparação dos diferentes soros com relação a cada sensibilização) pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ); \*não foi testado.

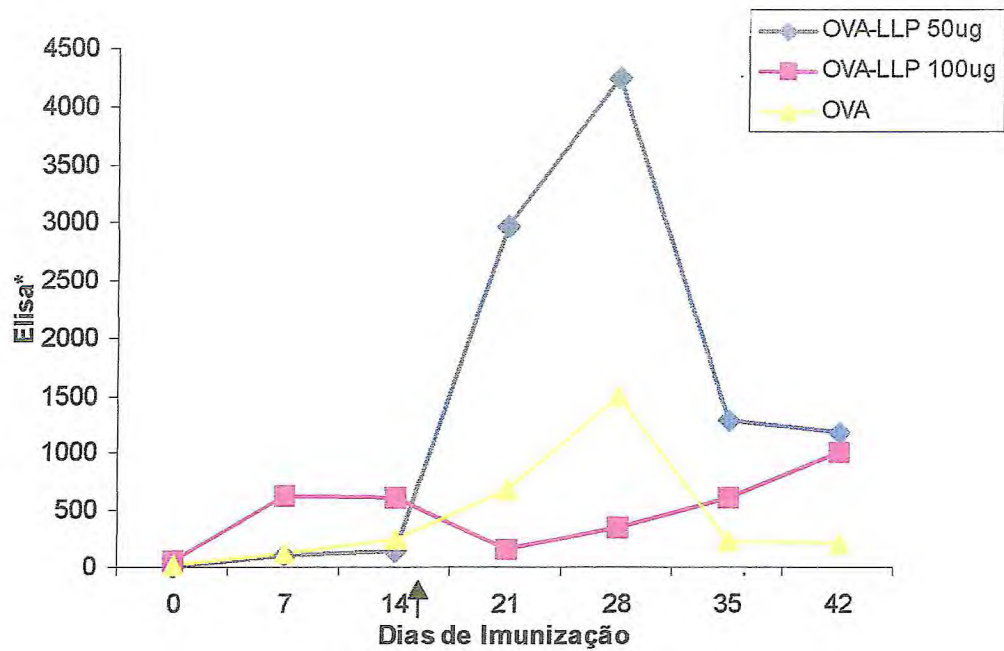
#### **4.5.1.2 Avaliação do Efeito Adjuvante**

##### **4.5.1.2.1 Síntese de Anticorpos Anti-Ovalbumina (OVA) induzidos por LLP e Al(OH)<sub>3</sub>**

A resposta humoral de camundongos à imunização com solução conjugada de ovalbumina e 50 µg LLP foi caracterizada por expressivos títulos de anticorpos anti-OVA. A análise das curvas de síntese de anticorpos estimulados pela lectina nas doses 50 e 100 µg, mostrou diferenças entre os títulos alcançados durante a 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semana, quando a maior concentração apresenta os valores mais baixos (Figura 10). Relativamente ao Al(OH)<sub>3</sub>, LLP (50 µg/ dose) proporcionou a síntese de anticorpos anti-OVA em valores significativamente superiores ( $p \leq 0,05$ ), ao longo da evolução da resposta secundária, apresentado picos expressivos no 21<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dia. LLP, tal como o Al (OH)<sub>3</sub>, não foi capaz de induzir a produção de anticorpos na resposta primária (Figura 11).

##### **4.5.1.2.2 Síntese de Anticorpos Anti-OVA Induzida por LLP Conjugada aos Carboidratos D-glucose/ D-manose e N-acetil- D-glucosamina**

LLP-OVA foi diluída em soluções de D-manose/ D-Glucose e N-acetil-D-glucosamina (0,1M cada) antes de ser injetada nos camundongos. Os resultados, representados na Figura 12, mostram que esses açúcares, de forma inespecífica, não só inibiram significativamente a ação adjuvante de LLP, como modularam negativamente a síntese de anticorpos anti-OVA.



**Figura 10.** Cinética da síntese de anticorpos específicos, determinados por ELISA, em camundongos imunizados por via subcutânea com 10 µg de ovalbumina pura ou associada a diferentes doses de LLP: 50 e 100 µg/animal. Cada ponto corresponde à média dos escores de Elisa\* obtidos de cinco animais e são representativos de dois experimentos independentes. Os valores que deram origem ao gráfico, bem como o grau de significância entre eles está mostrado na Tabela 8. → indica o dia da injeção da dose de reforço .

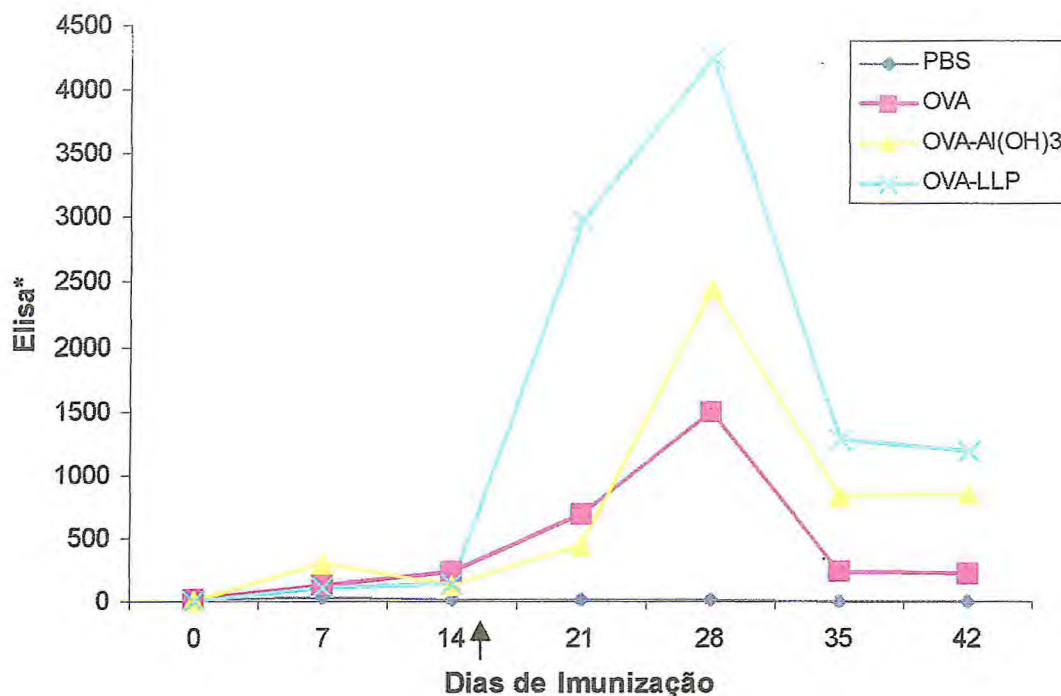


**TABELA 8 Cinética da síntese de anticorpos específicos para OVA produzidos por camundongos inoculados com OVA pura e associada à diferentes doses de LLP: 50 e 100 $\mu$ g**

Tratamentos	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
OVA-LLP 50 $\mu$ g	7 $\pm$ 4E	110 $\pm$ 64bD	138 $\pm$ 65cD	2971 $\pm$ 494aAB	4232 $\pm$ 417aA	465 $\pm$ 91aBC	3299 $\pm$ 254aC
OVA-LLP 100 $\mu$ g	56 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup> D	633 $\pm$ 141aB	600 $\pm$ 262bB	160 $\pm$ 248bC	347 $\pm$ 203cC	604 $\pm$ 452aB	1000 $\pm$ 582bA
OVA	21 $\pm$ 17E	125 $\pm$ 33bD	240 $\pm$ 35cC	677 $\pm$ 136bB	1495 $\pm$ 320bA	299 $\pm$ 107bCD	212 $\pm$ 50cCD

Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre linhas (comparação dos diferentes tratamentos dentro de cada dia) pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre colunas (evolução da resposta a cada tratamento ao longo dos dias) pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).



**Figura 11.** Cinética da síntese de anticorpos específicos, determinados por ELISA, em grupos de camundongos imunizados por via subcutânea com 10 µg de ovalbumina pura, ou associada à LLP ou ao Al(OH)<sub>3</sub>. Cada ponto corresponde à média dos escores de Elisa\* obtidos de cinco animais e são representativos de dois experimentos independentes. Os valores que deram origem ao gráfico, bem como o grau de significância entre eles está mostrado na Tabela 9. → indica o dia de inoculação da dose de reforço .

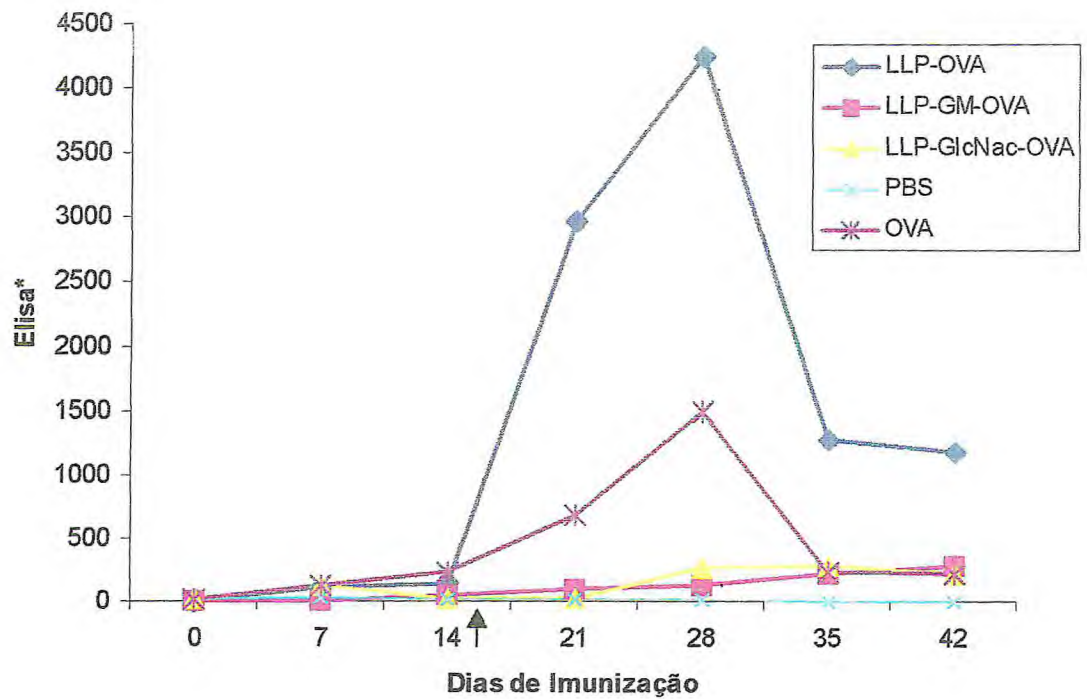
**TABELA 9. Cinética da síntese de anticorpos específicos produzidos por camundongos inoculados com solução de OVA pura ou conjugada à LLP ou ao Al(OH)<sub>3</sub>**

Tratamentos	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
LLP-OVA	7±4E	110±64bD	138±65cD	2971±494aAB	4232±417aA	465±91aBC	3299±254aC
LLP-Al(OH) <sub>3</sub>	7±12E	292±62aC	130±23cD	439±67bC	2439±354bA	820±166aB	844±208aB
OVA	21±17E	125±33bD	240±35bC	677±136bB	1495±320cA	299±107cCD	212±50bCD
PBS	10±12C	27±13dA	22±12eAB	12±4dBC	9±8dBC	6±3dC	5±2cC

Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre linhas (comparação dos diferentes tratamentos dentro de cada dia) pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre colunas (evolução da resposta a cada tratamento ao longo dos dias) pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).





**Figura 12.** Cinética da síntese de anticorpos específicos, determinados por ELISA, em grupos de camundongos imunizados por via subcutânea com 10  $\mu\text{g}$  de ovalbumina pura e associada a 50  $\mu\text{g}$  de LLP pura ou conjugada a diferentes carboidratos (0,1M). Cada ponto corresponde à média dos escores de Elisa\* obtidos de cinco animais e são representativos de dois experimentos independentes. Os valores que deram origem ao gráfico, bem como o grau de significância entre eles está mostrado na Tabela 10.  $\rightarrow$  indica o dia da injeção da dose de reforço .

**TABELA 10. Cinética da síntese de anticorpos específicos produzidos por camundongos inoculados com o conjugado LLP-OVA, pura ou associada aos monossacarídeos N-acetil- D- glucosamina, D- e glucose/ D- manose**

Tratamentos	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
OVA-LLP	7 <sub>±</sub> 4 <sub>cE</sub>	110 <sub>±</sub> 64 <sub>cD</sub>	138 <sub>±</sub> 65 <sub>cD</sub>	2971 <sub>±</sub> 494 <sub>aAB</sub>	4232 <sub>±</sub> 417 <sub>aA</sub>	465 <sub>±</sub> 91 <sub>aBC</sub>	3299 <sub>±</sub> 254 <sub>aC</sub>
OVA-LLP-Glu/Man	7 <sub>±</sub> 9 <sub>cD</sub>	3 <sub>±</sub> 3 <sub>eD</sub>	51 <sub>±</sub> 12 <sub>dC</sub>	90 <sub>±</sub> 57 <sub>cC</sub>	131 <sub>±</sub> 91 <sub>dBC</sub>	337 <sub>±</sub> 283 <sub>cAB</sub>	306 <sub>±</sub> 207 <sub>bA</sub>
OVA-LLP-GlcNac	14 <sub>±</sub> 10 <sub>bcC</sub>	121 <sub>±</sub> 54 <sub>cB</sub>	12 <sub>±</sub> 4 <sub>eC</sub>	10 <sub>±</sub> 9 <sub>dC</sub>	262 <sub>±</sub> 94 <sub>cA</sub>	287 <sub>±</sub> 106 <sub>cA</sub>	217 <sub>±</sub> 55 <sub>bAB</sub>
OVA	21 <sub>±</sub> 17 <sub>bE</sub>	125 <sub>±</sub> 33 <sub>cD</sub>	240 <sub>±</sub> 35 <sub>bC</sub>	677 <sub>±</sub> 136 <sub>bB</sub>	1495 <sub>±</sub> 320 <sub>bA</sub>	299 <sub>±</sub> 107 <sub>cCD</sub>	212 <sub>±</sub> 50 <sub>bCD</sub>

Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre colunas (comparação dos diferentes tratamentos dentro de cada dia) pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre linhas (evolução da resposta a cada tratamento ao longo dos dias) pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

#### **4.5.1.1.1 Padrão Isotípico de Imunoglobulinas Anti-OVA Produzidas na Resposta Secundária (28 dias) em presença de Al(OH)<sub>3</sub> e de LLP pura ou Conjugada aos Carboidratos D-manose/ D-Glucose e N-acetil-D-glucosamina**

Considerando-se o 28º dia, a presença anticorpos anti-OVA da classe IgG foi detectada principalmente nos animais imunizados em presença do adjuvante ( $p \leq 0,05$ ). LLP, com valores mais modestos, também exerceu efeito estimulante na síntese dessas imunoglobulinas. Quanto à IgM, sempre observada em níveis inferiores à IgG, esta foi sintetizada por animais injetados com LLP, cujo efeito adjuvante da síntese de ambas as classes foi inibido de forma inespecífica pelos carboidratos co-injetados (Figura 13).

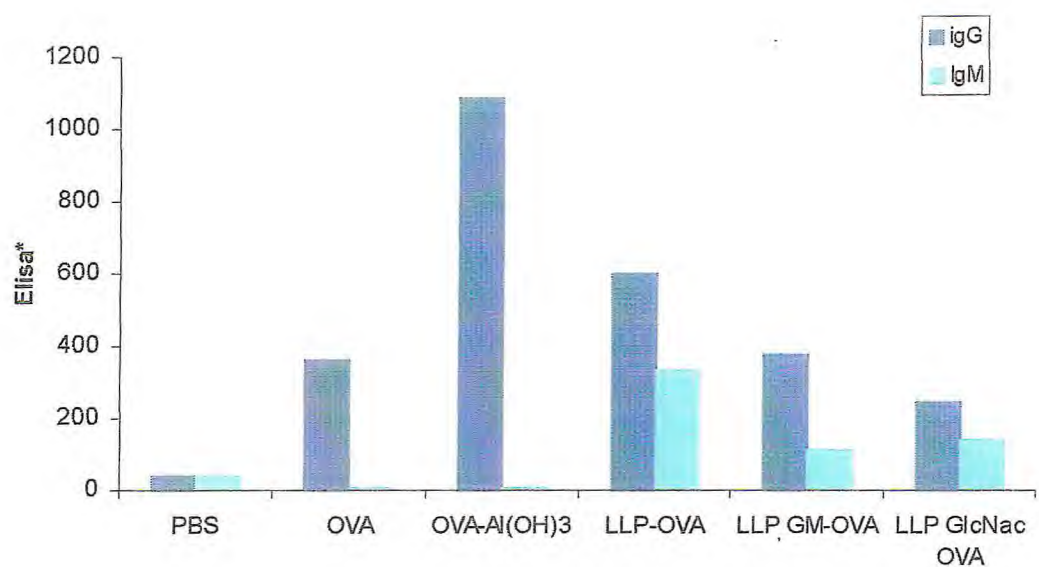
#### **4.5.1.1.2 Síntese de IgE anti-Ovalbumina Induzida em presença de LLP e Al(OH)<sub>3</sub>**

Não foi observada síntese de IgE anti-OVA na resposta primária induzida por ovalbumina em presença de LLP. Fato que também foi observado nos animais imunizados com Al(OH)<sub>3</sub>. No entanto esses dois tratamentos foram capazes de induzir à partir do 28º dia níveis equiparáveis de IgE (Figura 14).

#### **4.5.1.1.3 Síntese de IgE Específica para OVA Induzida em presença LLP Conjugada aos Açúcares D-manose/ D-Glucose e N-acetil-D-glucosamina**

A Figura 15 mostra que os açúcares só interferiram na cinética de IgE anti-OVA potenciada por LLP no 28º e 35º dia de imunização. No entanto, considerando-se os soros de animais imunizados com OVA pura, o complexo LLP-açúcar-OVA ainda proporcionou a síntese de IgE em títulos superiores ao longo da resposta secundária. Não foram determinadas diferenças significativas entre os efeitos dos carboidratos D-manose/ D-Glucose e N-acetil-D-glucosamina.





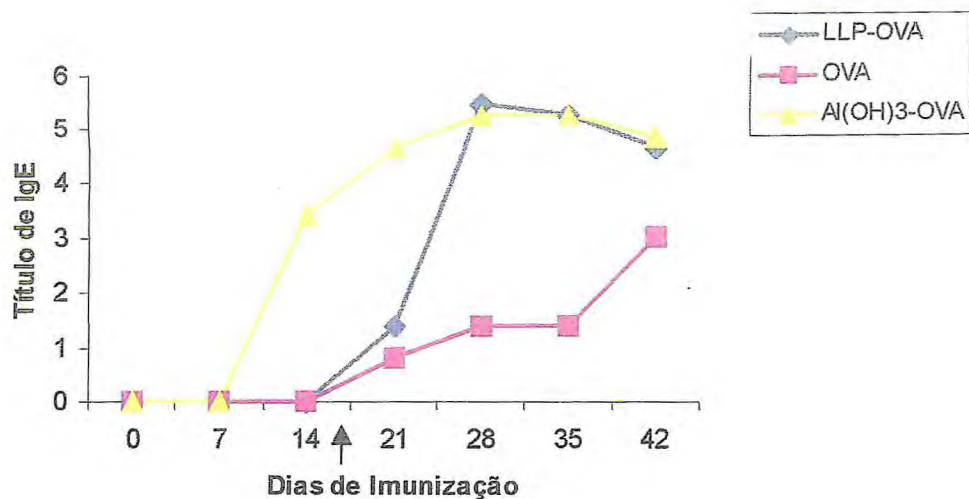
**Figura 13.** Padrão isotípico de anticorpos específicos, determinado por ELISA, produzido na resposta secundária (28 dias) à imunização subcutânea com ovalbumina pura ou associada ao Al(OH)<sub>3</sub> ou à 50 µg de LLP . Cada ponto corresponde à media dos escores de Elisa\* obtidos de cinco animais e são representativos de dois experimentos independentes. Os valores que deram origem ao gráfico, bem como o grau de significância entre eles está mostrado na Tabela 11.

**TABELA 11. Padrão isotípico da síntese de imunoglobulinas anti-OVA na resposta secundária (28 dias)**

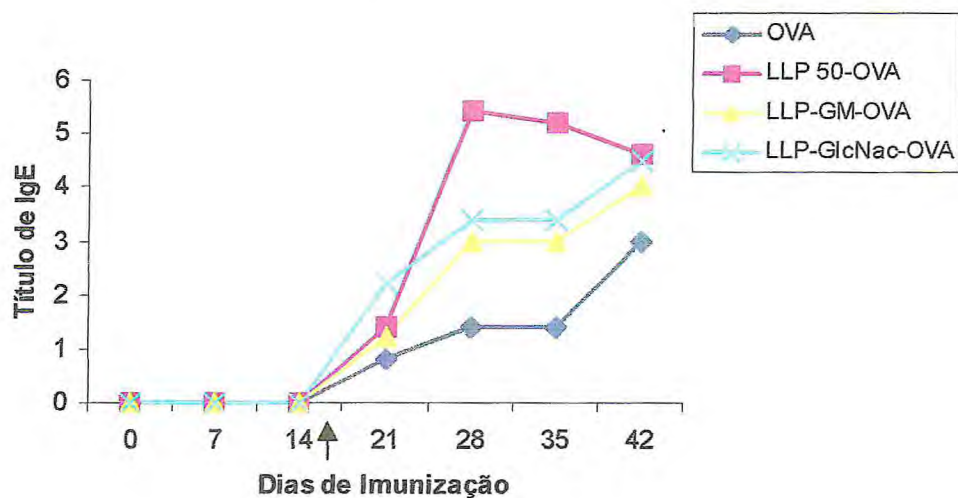
Imunoglobulinas	LLP-OVA	OVA	OVA-Al(OH) <sub>3</sub>	LLP-OVA-Glu/Man	LLP-Ova-GlcNAc
IgG	598±98a	362±170 <sup>a</sup> b	1081±213a	379±166b	242±211b
IgM	334±185a	8±5d	2±1d	113±77bc	137±133bc

Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre colunas (comparação dos diferentes tratamentos dentro do isotipo) pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre linhas (comparação entre classes dentro do tratamento) pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).



(A)



(B)

Figura 14. Cinética da síntese de IgE, em camundongos imunizados por via subcutânea: (A) com OVA pura ou em presença de  $\text{Al}(\text{OH})_3$  ou LLP; (B) com OVA pura ou em presença de LLP pura ou conjugada a diferentes carboidratos. Os valores que deram origem ao gráfico, bem como o grau de significância entre eles está mostrado nas Tabelas 12 e 13.  $\rightarrow$  indica o dia da dose de reforço.



**TABELA 12. Cinética da síntese de IgE específica, determinada pela técnica de PCA, produzidos por camundongos inoculados com ovalbumina pura e associada a lectina de *Lablab purpureus* ou ao  $Al(OH)_3$**

Tratamentos	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
OVA-LLP	0 $\pm$ 0bA	0 $\pm$ 0bC	0 $\pm$ 0bC	1,4 $\pm$ 1,3bB	5,4 $\pm$ 0,5aA	5,2 $\pm$ 0,4aA	4,6 $\pm$ 0,55aA
OVA- $Al(OH)_3$	0 $\pm$ 0bC	0 $\pm$ 0bC	3,4 $\pm$ 0,9aB	4,6 $\pm$ 0,5aAB	5,2 $\pm$ 0,4aA	5,2 $\pm$ 0,8aA	4,8 $\pm$ 0,8aAB
OVA	0 $\pm$ 0c	0 $\pm$ 0c	0 $\pm$ 0c	0,8 $\pm$ 0,4bB	1,4 $\pm$ 0,5cB	1,4 $\pm$ 0,5cB	3 $\pm$ 0,7bA
PBS	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0

Letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre linhas (comparação dos diferentes tratamentos dentro de cada tempo) pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre colunas (evolução da resposta a cada tratamento ao longo do tempo) pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

**TABELA 13. Cinética da síntese de IgE específica, determinada pela técnica de PCA, produzidos por camundongos inoculados com ovalbumina associada a LLP pura ou conjugada aos carboidratos D-glucose/ D-manose (GM) e N-acetil- D-glucosamina (GlcNac)**

Tratamentos	Dia 0	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 28	Dia 35	Dia 42
OVA-LLP	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	1,4 $\pm$ 1,3aB	5,4 $\pm$ 0,5aA	5,2 $\pm$ 0,4aA	4,6 $\pm$ 0,55aA
OVA-LLP-Glu/Man	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	1,2 $\pm$ 1,7aB	0,4 $\pm$ 0,9dCD	2 $\pm$ 3cB	4,2 $\pm$ 0,44aA
OVA-GlcNac	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	2,2 $\pm$ 2,3aB	3,4 $\pm$ 0,9bA	3,4 $\pm$ 1,1bA	4,8 $\pm$ 1,3aA
OVA	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0,8 $\pm$ 0,4aB	1,4 $\pm$ 0,5cB	1,4 $\pm$ 0,5cB	3 $\pm$ 0,7bA
PBS	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0b	0 $\pm$ 0e	0 $\pm$ 0d	0 $\pm$ 0c

#### 4.5.2 Avaliação dos Efeitos das Lectinas de *L. purpureus* e de *T. esculenta* (TEL) sobre *M. canis* e *Candida sp*

##### 4.5.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da Lectina de *T. esculenta* (TEL) e do Extrato Total e Lectina de *L. purpureus* sobre o Crescimento de *M. canis*

Em três experimentos independentes, os inóculos obtidos de 20 cepas de *M. canis* foram previamente homogeneizados em diluições seriadas de cada lectina antes de ser inoculado em placa de microdiluição contendo o meio RPMI. Após análise do crescimento dos fungos ao longo de cinco dias, foi determinada no final do período de observação a menor concentração capaz de inibir mais de 50% das cepas testadas. A tabela 14 demonstra os valores obtidos de cada diluição.

**TABELA 14. Concentração inibitória mínima dos tratamentos utilizados no ensaio antifúngico de microdiluição em placa**

Concentração $\mu\text{g.mL}^{-1}$	1000	500	250	125	62,5	31,2	15,12
LLP	80	66	55	48	34	0	0
ET-LP	92	74	50	30	25	15	0
TEL	85	80	74	62	29	24	0

Os valores representam três ensaios independentes e foram calculados sobre percentual de inibição de crescimento das 20 cepas de *M. canis* testadas.



#### **4.5.2.2 Evolução do Crescimento de *M. canis* em RPMI Tratados com LLP, ET e TEL na Concentração de 1000 $\mu$ g/mL .**

Conforme pode ser visto na Tabela 14, todos os tratamentos foram eficientes em inibir mais de 80% das cepas estudadas. Entretanto, como mostra a Figura 15, ET apresentou efeito inibitório mais significativos ( $p \leq 0,05$ ) com relação aos demais tratamentos. Na mesma figura pode-se observar que TEL apresentou valores quase constantes ao longo de toda a curva de crescimento do fungo.

#### **4.5.2.3 Evolução do Crescimento de *M. canis* em RPMI Tratados com LLP, ET e TEL na Concentração de 250 $\mu$ g/mL.**

Os cálculos das concentrações inibitórias mínimas mostraram que, de um modo geral, os tratamentos inibiram mais de 50% das cepas testadas de *M. canis*. Com relação à curva de crescimento do fungo (Figura 16), LLP exerceu efeito inibidor sobre o *M. canis* em ritmo semelhante ao apresentado por ET contrastando com TEL que proporcionou inibição nas primeiras 24 horas de incubação do fungo sem apresentar variação nesse efeito ao longo dos demais dias de observação.

#### **4.5.2.4 Evolução do Crescimento de *M. canis* em RPMI Tratados com LLP, ET e TEL na Concentração de 125 $\mu$ g/mL.**

Os valores inibitórios de LLP e ET sobre as cepas testadas (Figura 17), foram menos significativos ( $p < 0,05$ ) do que aqueles apresentados por TEL. Verificou-se ainda que TEL, dentre as demais substâncias estudadas, exerceu efeito mais estável sobre a curva do crescimento do fungo ao longo dos quatro dias de observação.



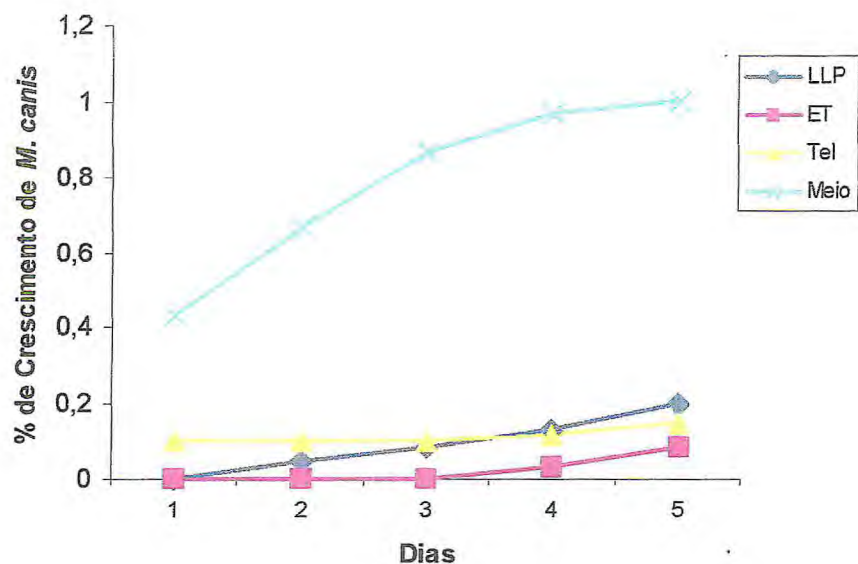


Figura 15. Evolução do crescimento de *M. canis* em RPMI após incubação prévia com lectina de *Talisia esculenta* (TEL), extrato total (ET) e lectina de *L. purpureus* (LLP), utilizados na concentração de  $1000\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ . Cada ponto corresponde à média de três experimentos independentes. Os valores numéricos que deram origem aos gráficos correspondem ao percentual de crescimento sobre as 20 cepas de *M. canis* estudadas. Esses dados, bem como o grau de significância entre eles, estão mostrados na Tabela 15.

TABELA 15. Evolução do crescimento de *Microsporium canis* em RPMI induzida por tratamento com TEL e com o extrato total e lectina de *Lablab purpureus* na concentração de  $1000\mu\text{g/mL}^{-1}$

Tratamentos	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
LLP	0 $\pm$ 0cC	0,05 $\pm$ 0,05bcC	0,083 $\pm$ 0,02bcB	0,13 $\pm$ 0,02bcAB	0,2 $\pm$ 0,05bcA
TEL	0,1 $\pm$ 0,050b	0,1 $\pm$ 0,05b	0,1 $\pm$ 0,05b	0,1 $\pm$ 0,02b	0,15 $\pm$ 0,05b
ET-LP	0 $\pm$ 0c	0 $\pm$ 0c	0 $\pm$ 0c	0,03 $\pm$ 0,02c	0,08 $\pm$ 0,02c
PBS	0,043 $\pm$ 0,02aD	0,66 $\pm$ 0,02aC	0,88 $\pm$ 0,02aB	0,98 $\pm$ 0,02aAB	1 $\pm$ 0aA

As médias representam os valores de três ensaios independentes, que são expressos em função do percentual de crescimento sobre 20 cepas de *M. canis* estudadas. Conforme análise não paramétrica de Kruskal Wallis, letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre linhas (comparação dos diferentes tratamentos dentro de cada dia) pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre colunas (evolução do crescimento a cada tratamento ao longo dos dias) pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

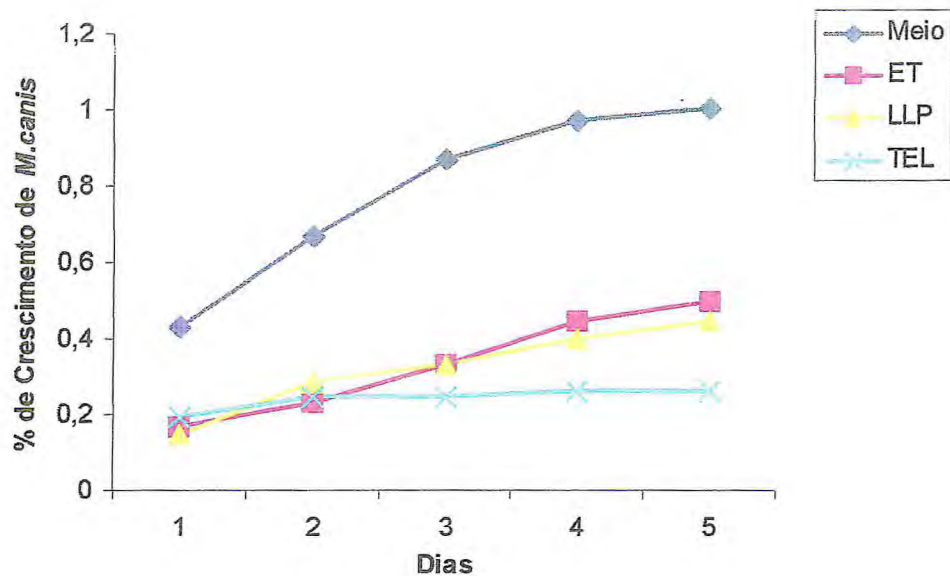


Figura 16. Evolução do crescimento de *M. canis* em RPMI após incubação prévia com lectina de *Talisia esculenta* (TEL), extrato total (ET) e lectina de *L. purpureus* (LLP), utilizados na concentração de  $250\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ . Cada ponto corresponde à média de três experimentos independentes. Os valores numéricos que deram origem aos gráficos correspondem ao percentual de crescimento sobre as 20 cepas de *M. canis* estudadas. Esses dados, bem como o grau de significância entre eles está mostrado na Tabela 16.



**TABELA 16. Evolução do crescimento de *Microsporium canis* em RPMI induzida por tratamento com TEL ou com o extrato total e lectina de *Lablab purpureus* na concentração de 250 $\mu$ g/mL<sup>-1</sup>**

Tratamentos	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
LLP	0,15 $\pm$ 0,05bD	0,28 $\pm$ 0,02bC	0,33 $\pm$ 0,02bBC	0,4 $\pm$ 0bAB	0,45 $\pm$ 0bA
TEL	0,19 $\pm$ 0,02bA	0,25 $\pm$ 0,02bA	0,25 $\pm$ 0,02bA	0,26 $\pm$ 0,028cA	0,26 $\pm$ 0,028cA
ET-LP	0,066 $\pm$ 0,02bC	0,23 $\pm$ 0,02bB	0,333 $\pm$ 0,02bB	0,45 $\pm$ 0,05bA	0,5 $\pm$ 0,0bA
PBS	0,043 $\pm$ 0,02aD	0,66 $\pm$ 0,02aC	0,88 $\pm$ 0,02aB	0,98 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup> AB	1 $\pm$ 0aA

As médias representam os valores de três ensaios independentes, que são expressos em função do percentual de crescimento sobre 20 cepas de *M. canis* estudadas. Conforme análise não paramétrica de Kruskal Wallis, letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre colunas (comparação dos diferentes tratamentos dentro de cada dia) pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre linhas (evolução do crescimento a cada tratamento ao longo dos dias) pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

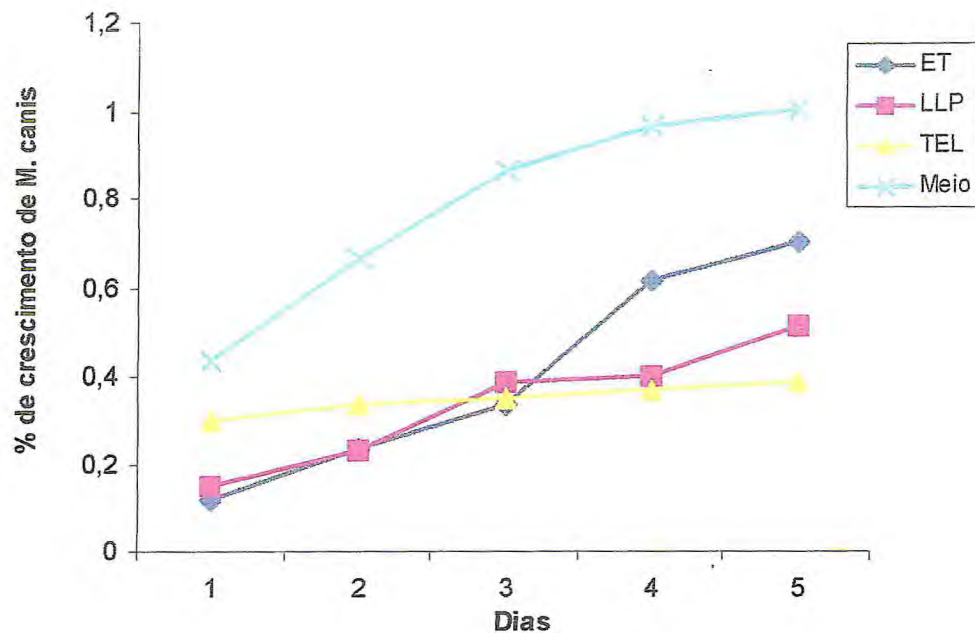


Figura 17. Evolução do crescimento de *M. canis* em RPMI após incubação prévia com lectina de *Talisia esculenta* (TEL), extrato total (ET) e lectina de *L. purpureus* (LLP) Efeito comparativo entre ET, LLP e TEL, utilizados na concentração de  $125\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ . Cada ponto corresponde à media de três experimentos independentes. Os valores numéricos que deram origem aos gráficos correspondem ao percentual de crescimento sobre as 20 cepas de *M. canis* estudadas. Esses dados, bem como o grau de significância entre eles está mostrado na Tabela 17.

**TABELA 17. Evolução do crescimento de *Microsporium canis* em RPMI induzida por tratamento com TEL, com extrato total ou com lectina de *Lablab purpureus* na concentração de 125 $\mu$ g/mL<sup>-1</sup>**

Tratamentos	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
LLP	0,15 $\pm$ 0,05cC	0,23 $\pm$ 0,02bC	0,38 $\pm$ 0,02bB	0,4 $\pm$ 0bcB	0,5 $\pm$ 0,02cA
TEL	0,3 $\pm$ 0bA	0,33 $\pm$ 0,02bA	0,35 $\pm$ 0bA	0,36 $\pm$ 0,02cA	0,38 $\pm$ 0,02dA
ET-LP	0,11 $\pm$ 0,02cD	0,23 $\pm$ 0,02bD	0,33 $\pm$ 0,02bC	0,61 $\pm$ 0,05bB	0,7 $\pm$ 0bA
PBS	0,043 $\pm$ 0,02aD	0,66 $\pm$ 0,02aC	0,88 $\pm$ 0,02aB	0,98 $\pm$ 0,02aAB	1 $\pm$ 0 <sup>a</sup> A

As médias representam os valores de três ensaios independentes, que são expressos em função do percentual de crescimento sobre 20 cepas de *M. canis* estudadas. Conforme análise não paramétrica de Kruskal Wallis, letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre colunas (comparação dos diferentes tratamentos dentro de cada dia) pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre linhas (evolução do crescimento a cada tratamento ao longo dos dias) pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).



#### **4.5.2.5 Evolução do Crescimento de *M. canis* Tratado com LLP Associado a Carboidratos**

A investigação dos efeitos de LLP sobre o crescimento do *M. canis*, incluiu ainda a sua interação com carboidratos específicos. A interferência desses componentes com a ação inibitória da lectina, detectada através da evolução do crescimento do fungo, pode ser vista na Figura 18. Relativamente à ação de LLP, os carboidratos testados, de um modo geral, apresentaram valores significativamente ( $p \leq 0,05$ ) superiores. N-acetil-D-glucosamina melhor que D-manose e D-Glucose .

#### **4.5.2.6 Evolução do Crescimento de *M. canis* a partir do Tratamento de pêlos Infectados com Artrosporos de ET e LLP na Concentração de 1000 $\mu$ g/mL**

Os efeitos de LLP e ET sobre o *M. canis* foram avaliados frente ao artrosporos desses fungos presentes em pêlos de animais infectados. Relativamente ao crescimento do fungo em ágar Sabouraud foi verificado que tanto LLP como ET, exerceram significativa ( $p < 0,05$ ) ação inibitória ao longo dos 21 dias de observação(Figura 19).

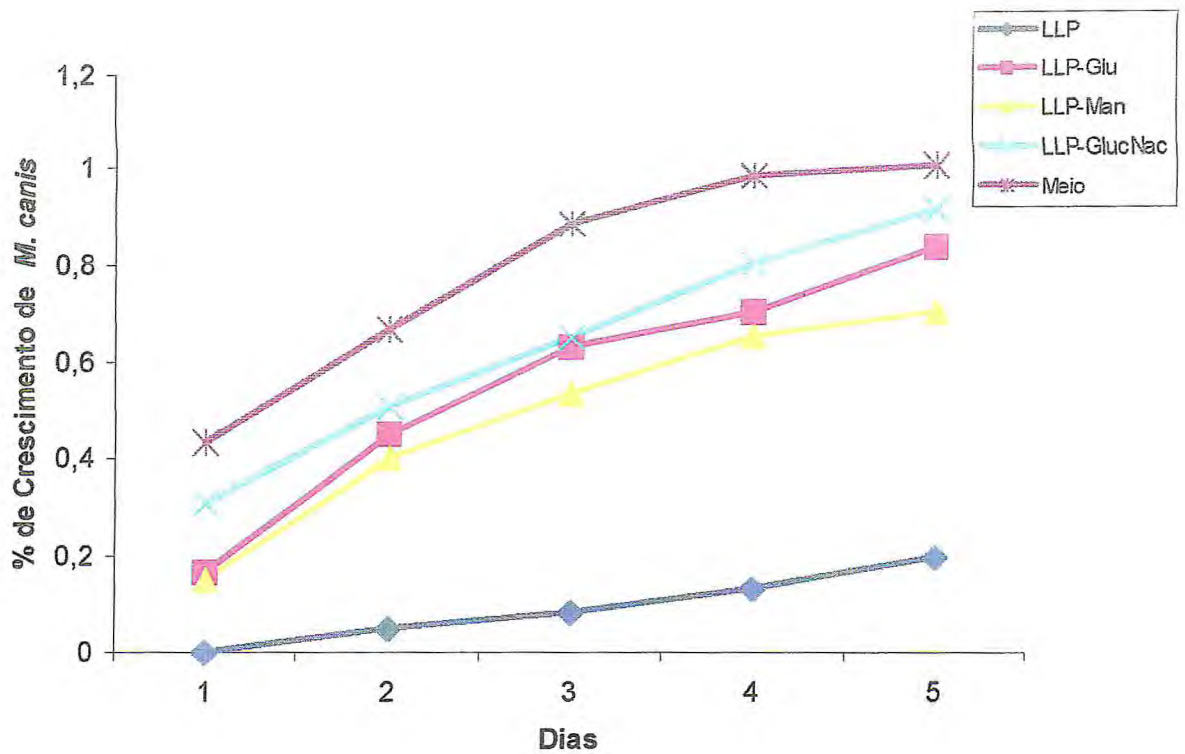


Figura 18. Evolução do crescimento de *M. canis* em RPMI após incubação prévia com lectina de *L. purpureus* (LLP) conjugada aos carboidratos D-glucose, D-manose e N-acetil-D-glucosamina. Cada ponto corresponde à media de três experimentos independentes. Os valores numéricos que deram origem aos gráficos correspondem ao percentual de crescimento sobre as 20 cepas de *M. canis* estudadas. Esses dados estão mostrados na Tabela 18.

**TABELA 18. Evolução do crescimento de *Microsporium canis* em RPMI a partir do tratamento do inóculo com a lectina de *Lablab purpureus* (LLP) pura ou conjugada aos monossacarídeos N-acetil- D- glucosamina, D- glucose e D- manose**

Tratamentos	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5
LLP	0±0dC	0,05±0,05cC	0,08±0,02dB	0,1±0,02dAB	0,2±0,05dA
LLP-Glu	0,16±0,02cD	0,45±0,08bC	0,63±0,02bB	0,7±0,05	0,83±0,05bA
LLP-Man	0,1±0,07cC	0,4±0,07bB	0,5±0,18cB	0,65±0,15cA	0,71±0,1cA
LLP-GlcNac	0,31±0,02bD	0,51±0,07bC	0,65±0,05bB	0,8±0,05bA	0,91±0,07abA
PBS	0,43±0,02aD	0,66±0,02aC	0,88±0,02aB	0,98±0,02aAB	1±0aA

As médias representam os valores de três ensaios independentes, que são expressos em função do percentual de crescimento sobre 20 cepas de *M. canis* estudadas. Conforme análise não paramétrica de Kruskal Wallis, letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre colunas (comparação dos diferentes tratamentos dentro de cada dia) pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre linhas (evolução do crescimento a cada tratamento ao longo dos dias) pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).



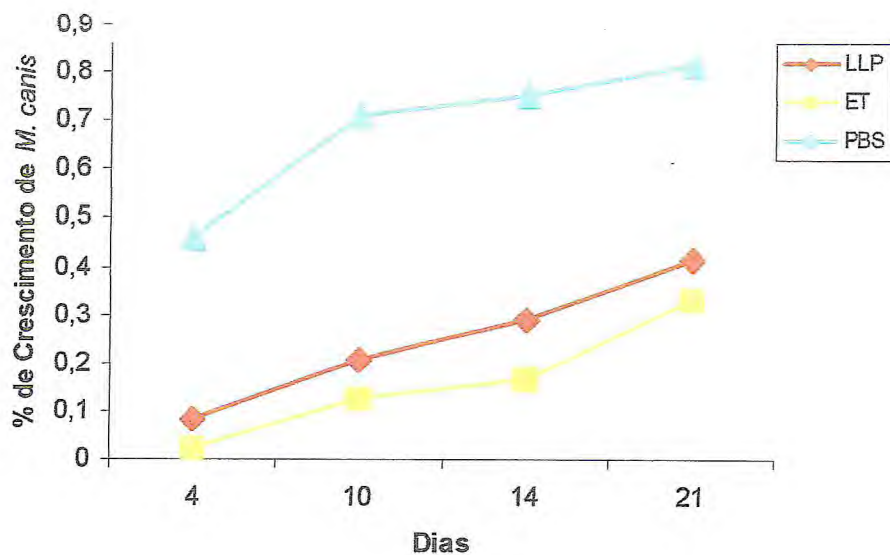


Figura 19. Evolução do crescimento de *M. canis* após incubação prévia de pêlos artrosporados com a lectina (LLP) e extrato total (ET). Cada ponto corresponde à média de três experimentos independentes. Os valores numéricos que deram origem aos gráficos correspondem ao percentual de crescimento sobre as 16 amostras de pêlos estudadas. Esses dados estão mostrados na Tabela 19.

**TABELA 19. Evolução do crescimento de *Microsporium canis* em ágar Sabouraud a partir do tratamento de pêlos contendo artrosporos com a lectina de *Lablab purpureus* (LLP) e com o extrato total de sementes de *Lablab purpureus* (ETLLP)**

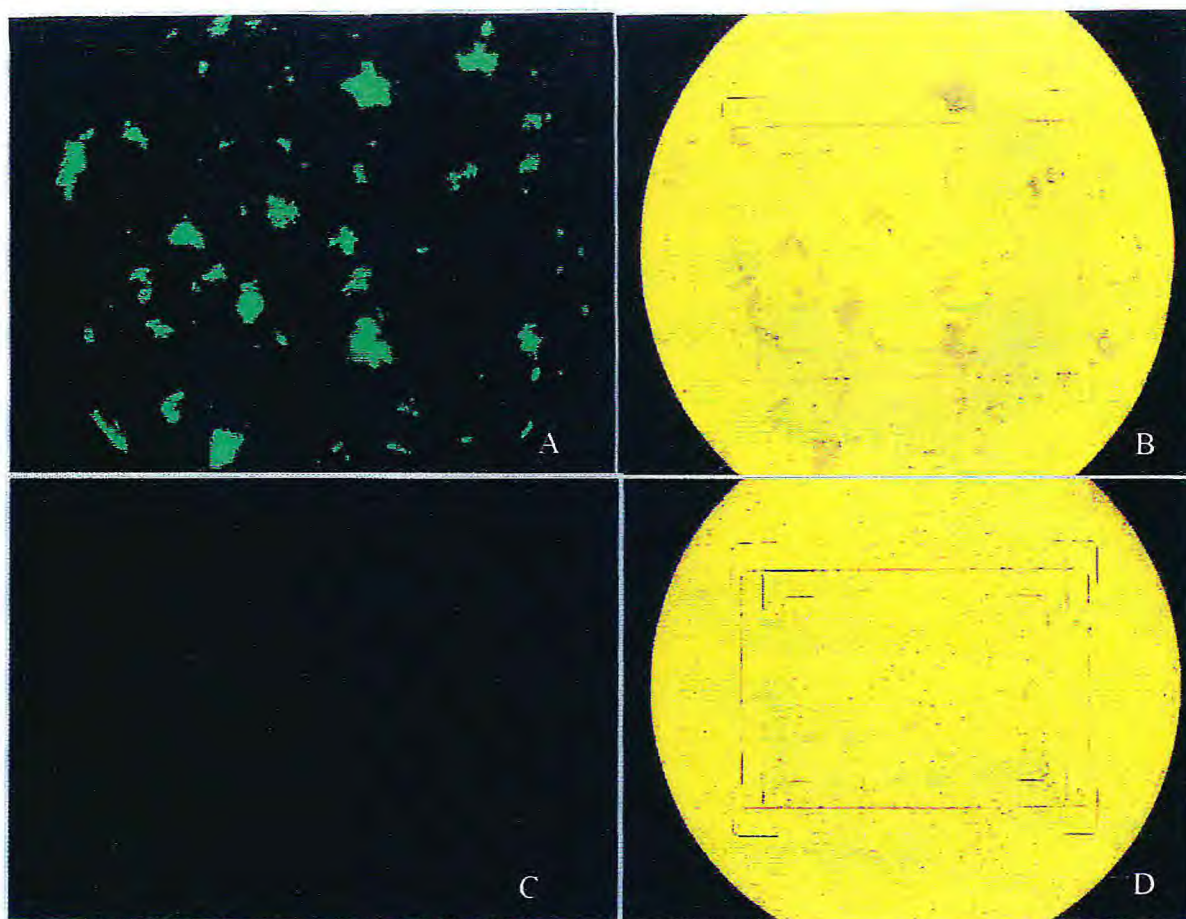
Tratamentos	Dia 4	Dia 10	Dia 14	Dia 21
LLP	0,08±0,03 Cb	0,20± 0,03Bb	0,29±0,03 Bc	0,41±0,07 Ab
ET-LP	0,020± 0,036Cb	0,12±0 Bb	0,16± Bc0,03	0,33±0,09 Ab
PBS	0,45±0,03 Ca	0,70±0,07 Ba	0,75± 0,06Bc	0,81±0,06 Ab

As médias representam os valores de três ensaios independentes, que são expressos em função do percentual de crescimento sobre 16 amostras de pelos infectados. Conforme análise não paramétrica de Kruskal Wallis, letras minúsculas distintas representam diferenças significativas entre linhas (comparação dos diferentes tratamentos dentro de cada dia) pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ). Letras maiúsculas distintas representam diferenças significativas entre colunas (evolução do crescimento a cada tratamento ao longo dos dias) pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ).

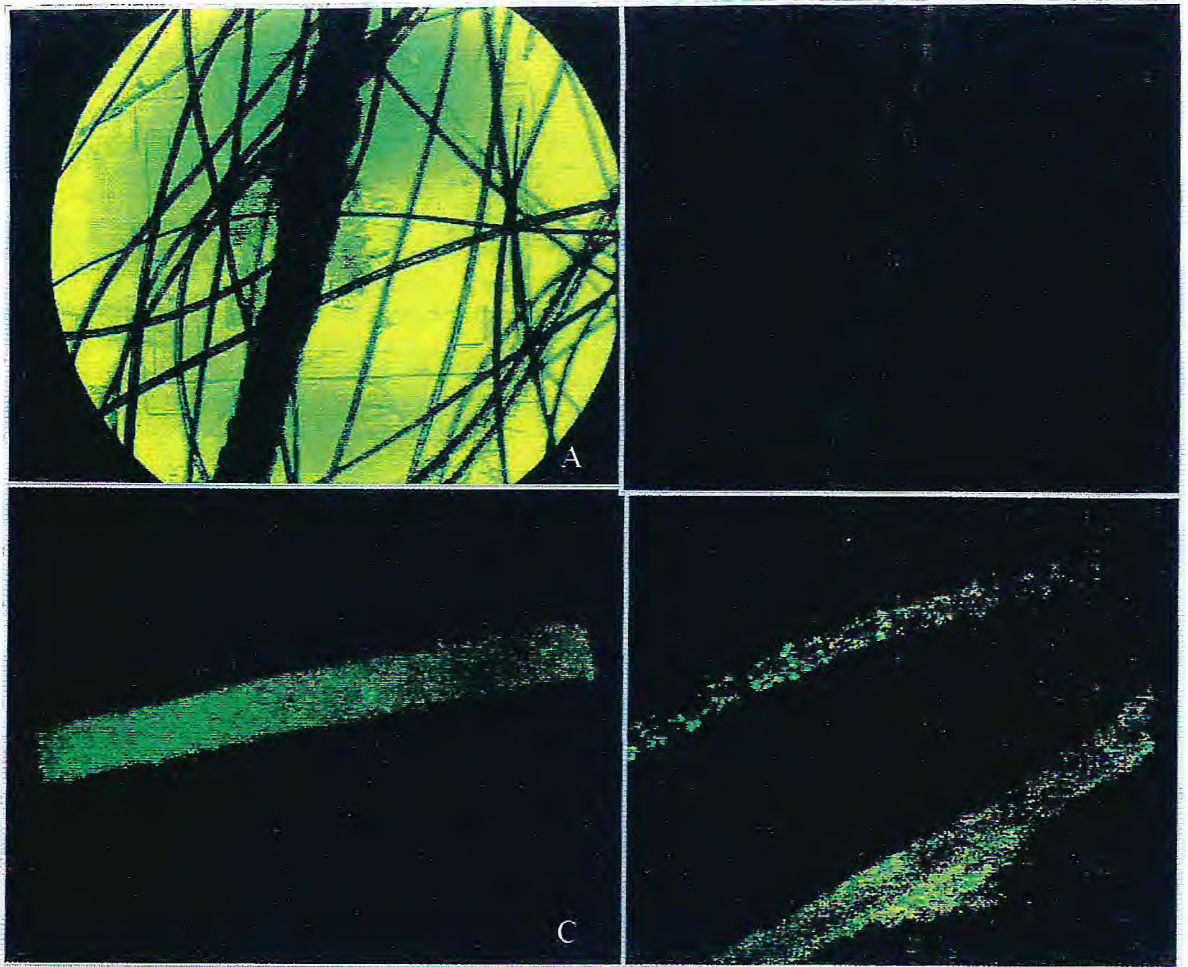
#### **4.5.2.7 Análise Microscópica dos Efeitos de LLP e TEL Conjugadas a FITC sobre *M. canis* e Leveduras do Gênero *Candida***

Foram investigadas, à microscopia de fluorescência, amostras de *M. canis* obtidas de cultura *in vitro* e de pêlos de animais infectados tratados com LLP e TEL conjugadas á FITC. Imagens representativas desses achados estão mostradas na Figuras 20,21 e 22. Comparadas às amostras controle tratadas com PBS e com LLP (Figura 20C), as leveduras marcadas com TEL podem ser visualizadas na Figura 20A. Os achados microscópicos mostrados na Figura 21 são correspondentes aos pêlos contendo artrosporos de *M. canis* tratados com LLP (Figura 21B) e TEL fluoresceinadas (Figura 21C-D). Observa-se que essas amostras apresentaram fluorescência natural que não foi alterada pelo tratamento com LLP, porém tornou-se mais quando foi tratada com TEL (Figura 21B). Essas mesmas características foram observadas com relação aos macroconídios obtidos de cultura *in vitro* de *M. canis* (Figura 22)



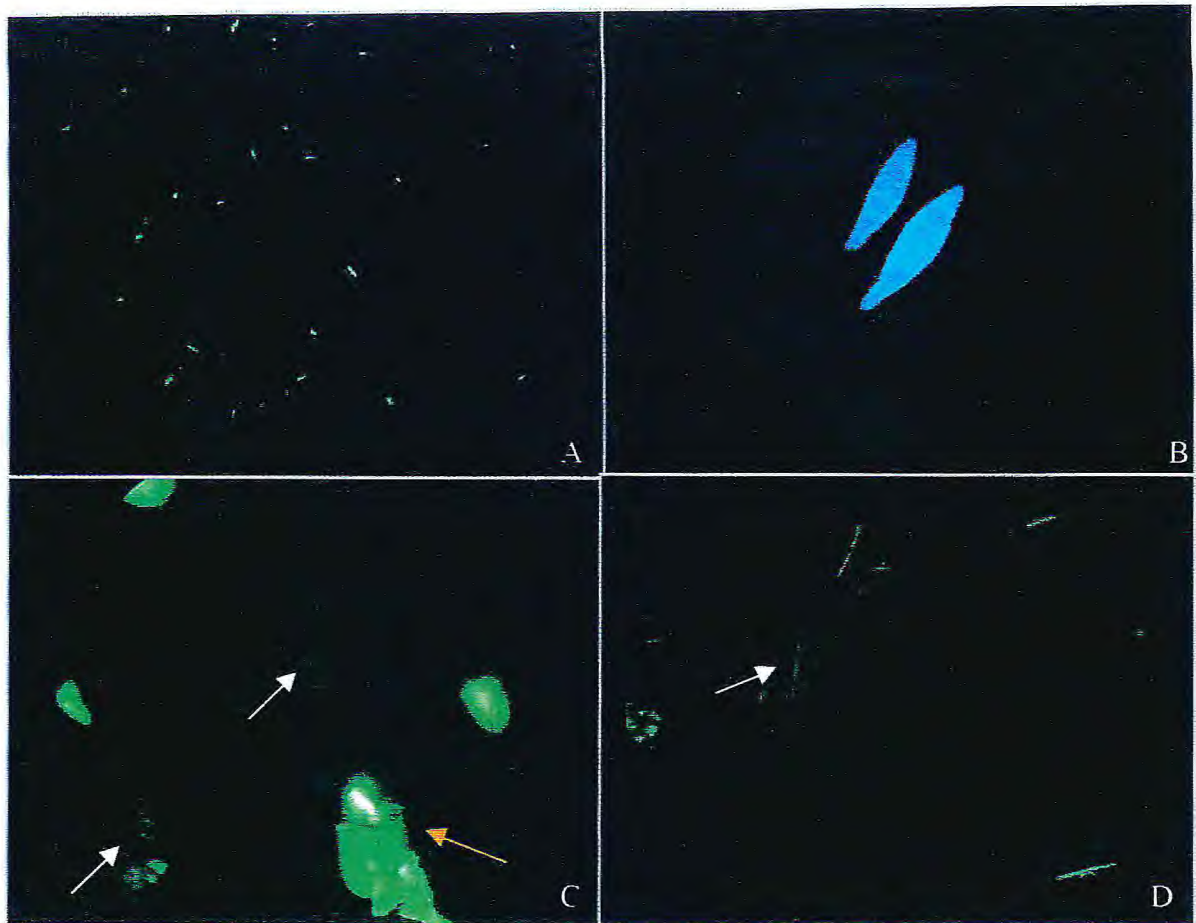


**Figura 20.** Efeito de LLP e TEL conjugadas a FITC sobre leveduras do gênero *Candida*. (A) leveduras tratadas com solução de PBS pura ou contendo LLP conjugada à FITC observadas à microscopia de fluorescência e (B) luminosa simples (200X). (C) leveduras tratadas com solução de TEL conjugada à FITC observadas à microscopia de fluorescência e (D) luminosa simples (200X).



**Figura 21.** Efeito de LLP e TEL conjugadas a FITC sobre artrosporos de *M. canis* presentes em pêlos de animais infectados. (A) amostra de pelo infectado com artrosporos à microscopia luminosa simples (200X). (B) figura representativa da fluorescência natural do pelo infectado tratado com solução de PBS pura ou contendo LLP (200X). (C) e (D) amostras de pêlos infectados tratados com TEL à microscopia de fluorescência (200X).





**Figura 22. Efeito de LLP e TEL conjugadas a FITC sobre macroconídios de *M. canis*.** (A) inóculo contendo macroconídios tratado com solução contendo TEL conjugada à FITC observada à microscopia de fluorescência (100X). (B) detalhe do macroconídio tratado com TEL conjugada à FITC observado à microscopia de fluorescência (400X). (C) inóculo contendo macroconídios tratado com LLP conjugado à FITC observado à microscopia de fluorescência. A seta branca aponta para a fluorescência natural do fungo e à fluorescência de fragmentos do meio de cultura marcados com a lectina (200X). (D) fragmentos de quitina (SIGMA) observados à microscopia de fluorescência (400X).



## 5 DISCUSSÃO

---

Em nosso laboratório foram realizados estudos pioneiros acerca da atividade hemaglutinante de proteínas isoladas de sementes *L. purpureus* (L) Sweet originária da Bahia (SILVA-LIMA *et al.*,1988; LEOPOLDO *et al.*,1994), nos quais foi verificado que a aglutinação de hemácias de coelhos induzida por extrato total e por frações protéicas parcialmente purificadas em coluna de quitina apresentavam padrões distintos de ligação aos carboidratos GlucNAc, galactose, manose e glucose. Nesse trabalho, considerando as características químicas elementares dessas sementes (TABELA 2) isolou-se uma lectina com afinidade de ligação a glicose e manose. Para tanto, foi utilizada uma coluna de afinidade ovalbumina-sepharose 4B descrita por MO *et al.* (1990), e por eles preconizada para o isolamento da lectina glucose-manose específica a partir de sementes de *Dolichos lablab* (Figura 4). A hemaglutinina aqui isolada (LLP) apresentou, a partir de cromatografia de filtração em gel, massa molecular aparente de 67 kDa. A eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) mostrou cinco bandas protéicas, cada uma com massa molecular aparente variando entre 10 e 22 kDa (Figura 5). A atividade hemaglutinante foi utilizada para acompanhar a purificação da lectina bem como para determinar o seu padrão de ligação a carboidratos. Tal como a lectina isolada por MO *et al.*, LLP apresentou afinidade pelos monossacarídeos D-manose, D- glucose e GlcNAc (TABELA 3).

Esses resultados são consistentes com aqueles obtidos por SILVA-LIMA *et al.*,(1988), uma vez que esses autores identificaram em frações protéicas parcialmente purificadas esse mesmo padrão de afinidade por carboidratos. Os dados de LEOPOLDO *et al.*,(1994) também corroboram com os desse estudo já que enfatizaram a presença de diferentes lectinas com afinidades variadas por monossacarídeos, sobretudo glucose, manose e GlcNAc.

Estudos anteriores já destacaram propriedades imunoestimulantes em lectinas de sementes de *Lablab purpureus* revelando seus efeitos mitogênicos sobre linfócitos humanos e células animais (FAVERO et al., 1986-1988; CAMPOS, 1990). Aliam-se a esses, dados do nosso laboratório que demonstraram a alergenicidade de frações protéicas parcialmente purificadas dessa leguminosa (ARAGÃO, 1990; PEREIRA, 2000). Os resultados aqui apresentados descrevem características imunogênicas e adjuvantes de lectina de sementes de *L. purpureus* (L) Sweet originária da Bahia (LLP), obtida segundo MO et al., (1999).

No que tange a ser imunogênica, LLP promoveu resposta humoral secundária expressiva, como pode ser verificado na Figura 6, onde as curvas de síntese de anticorpos específicos induzidos por LLP nas doses de 50 e 100 µg mostram que a precocidade e a magnitude da resposta secundária ocorreu quando foi usada a maior dose do antígeno sensibilizante.

A peculiar atividade imunogênica de lectinas sobre a síntese de anticorpos já foi amplamente discutida na literatura, que inicialmente atribuiu à mitogenicidade como o principal mecanismo de imunoestimulação dessas moléculas. Considera-se, além dessa, outras possibilidades, uma vez que várias lectinas não mitogênicas já foram capazes, como proteínas, de estimular resposta imunológica humoral. (LAVELLE et al., 2000). RUDD et al., (2004) enfatizaram que, de um modo geral, a ação imunogênica de lectinas é dependente da capacidade dessas moléculas interagirem especificamente com glicoconjugados de superfície de células do sistema imune. Isto porque tanto carboidratos como lectinas, seja na forma solúvel ou ligada à membrana, estão largamente distribuídas nos tecidos animais e em microrganismos.

O presente estudo buscou relacionar a imunogenicidade de LLP ao seu padrão de ligação a carboidratos. Para tanto, grupos de camundongos foram imunizados por via subcutânea com soluções da lectina associada aos seus respectivos açúcares inibidores: D-glucose/ D-manose (0,2M) e N-acetil-D-glucosamina (0,1M). A análise dos soros desses animais evidenciou baixos níveis de imunoglobulinas contra LLP. Como mostra a Figura 7, tal efeito revelou-se de forma expressiva e duradoura no decorrer da resposta secundária, quando se

observa, inclusive, alteração considerável na cinética da síntese de anticorpos. Esses dados sugerem que o mecanismo de ação imunogênico de LLP, aqui avaliada através da sua capacidade de desencadear a síntese de títulos altos de imunoglobulinas específicas, esteve relacionada à sua interação com carboidratos.

É bem estabelecido que a regulação da mudança de classes de imunoglobulinas por um antígeno dependente de linfócitos T é controlada *in vitro* e *in vivo* pela secreção de citocinas que refletem um padrão de ativação de diferentes linfócitos e subpopulações de células T auxiliares CD4+. Conforme mostra a Figura 8, o perfil isotípico dos anticorpos específicos produzidos na resposta imunológica secundária por camundongos inoculados com LLP foi caracterizado por consideráveis títulos de anticorpos específicos do tipo IgG e baixos títulos de anticorpos específicos do tipo IgM. Esses resultados representam, em parte, o padrão clássico de resposta imunológica humoral secundária à antígenos timo-dependentes, na qual a IgG constitui o seu principal produto atuando ativamente em diversos sistemas efetores.

A pré-incubação de LLP com os açúcares específicos não afetou significativamente a síntese de anticorpos específicos do tipo IgG contra essa lectina, no entanto, pôde-se observar que ocorreu inibição da síntese de anticorpos específicos do tipo IgM (Figura 9). Esse dado estatístico, embora não seja conclusivo, pode ser fundamentado por observações de glicobiologistas que implicaram a presença de açúcares conjugados a imunógenos inespecíficos como fator responsável pela polarização da resposta humoral para síntese de IgG, em detrimento de IgM, uma vez que carboidratos adicionam às proteínas maiores possibilidades de reconhecimento por células do sistema imune (RUDD *et al.*, 2004; IRASOQUI *et al.*, 2001). Com base nesses fundamentos, cogita-se atribuir aos carboidratos injetados conjuntamente com a lectina tanto a interferência com o mecanismo de ação da lectina, que possivelmente está relacionado aos domínios de reconhecimento de carboidratos, como, ao mesmo tempo, o direcionamento da resposta imunológica para a ativação específica de subpopulações de linfócitos T.

Com o intuito de confirmar a tendência verificada na literatura atual quanto ao papel marcante da interação lectina-carboidrato nos fenômenos imunológicos,



analisou-se a eficiência de LLP adsorvida na placa de ELISA, após prévia incubação com monossacarídeos específicos, para detectar anticorpos reagentes. Como pode ser verificado na Figura 9, foram determinados baixos títulos de anticorpos contra LLP quando o antígeno aderido era a lectina associada a D-glucose/ D -manose. Esses resultados oferecem indícios de que os determinantes antigênicos contra os quais se direcionou a resposta humoral contra LLP estão concentrados em domínios de reconhecimento de carboidratos, particularmente dos monossacarídeos D-glucose/ D-manose.

Diante da evidente atividade imunogênica da lectina de *L. purpureus* sobre a síntese de anticorpos, investigou-se a possibilidade dessa proteína exercer efeito adjuvante sobre a resposta humoral contra ovalbumina, um antígeno glicoprotéico padrão correntemente utilizado em modelos experimentais de imunização artificial (HUNTINGTON & STEIN, 2001). Com esse propósito, os soros de camundongos inoculados com OVA, na forma de conjugados solúveis com LLP, foram analisados comparativamente àqueles imunizados com OVA pura ou associada ao adjuvante clássico  $Al(OH)_3$ . A Figura 11 mostra que LLP exerceu acentuada e duradoura atividade estimulante sobre a resposta anti-OVA, apresentando cinética em ritmo semelhante à que foi verificada na síntese de anticorpos contra LLP. Essa característica demonstra que a evolução da resposta imunológica contra OVA por camundongos imunizados com o complexo OVA-LLP reflete o mecanismo de ação da lectina.

O que foi observado sobre o efeito adjuvante de LLP soma-se a resultados alcançados por outros pesquisadores que também avaliaram a estimulação da resposta humoral contra moléculas que formam complexos solúveis com lectinas, através de resíduos glicídicos. Essas pesquisas utilizaram, além do sistema com ovalbumina (DANTAS *et al.*, 2000), outros antígenos, como microrganismos patogênicos (ALBUQUERQUE *et al.*, 1999), destacando as lectinas como possíveis candidatas a serem utilizadas como ferramentas em esquemas de vacinação.

A observação de que LLP foi capaz de potencializar a resposta de anticorpos ant-OVA, sugere que essa lectina pode ser utilizada não só como um adjuvante

em potencial, como fazer parte de um sistema carreador-hapteno, juntamente com a ovalbumina, já descrita como um clássico carreador de moléculas pouco imunogênicas (IRASOQUI *et al.*, 2001).

Ainda no sentido de avaliar se o efeito adjuvante de LLP sobre a resposta humoral anti-OVA estava relacionado à interação com carboidratos, estes foram associados à lectina e à OVA, e o efeito imunizante desse conjugado sobre a produção de anticorpos foi comparado ao de OVA pura e associada à LLP. Como pode ser visto na Figura 12, os monossacarídeos foram capazes de interferir com a ação adjuvante da lectina, valendo ressaltar que, com relação a esses efeitos, não foi determinada diferença significativa entre os açúcares estudados (Tabela 10). Esse aspecto demonstra que a ação inibitória dos carboidratos sobre a ação adjuvante de LLP traduz de forma inespecífica o seu padrão de ligação aos monossacarídeos testados e possivelmente o seu mecanismo adjuvante.

A principal finalidade da realização dos experimentos acima relatados foi verificar a importância da ação lectínica da proteína estudada. Os resultados mostraram que essa interação lectina-carboidrato está envolvida na indução da produção de anticorpos anti-OVA em presença de LLP, embora, seja também questionado se os carboidratos co-inoculados atuaram como competidores de ambas glicoproteínas, LLP e/ou OVA, por receptores glicídicos presentes na superfície de células do sistema imune. Essa hipótese é sustentada por evidências da literatura que demonstram a presença de receptores de reconhecimento padrão presentes no soro, associados ao complemento, na linfa, ou ainda fazendo parte da superfície de células fagocitárias, ligando compostos contendo resíduos de manose, de N-acetil- D-glucosamina ou de fucose e ainda de oligossacarídeos sulfatados (MARCIONI, 2003).

A determinação do padrão isotópico da resposta humoral secundária anti-OVA (28 dias) estimulada por LLP revelou que houve síntese de anticorpos específicos do tipo IgG em níveis equiparáveis aos dos soros de camundongos imunizados com OVA pura, no entanto, ligeiramente inferiores àqueles induzidos por OVA associada ao adjuvante Al(OH)<sub>3</sub> (Figura 13). Logo, foi possível perceber, que na análise da síntese de anticorpos totais, LLP apresentou melhor efeito adjuvante do

que o hidróxido de alumínio, mas quando a presença de anticorpos específicos do tipo IgG foi analisada isoladamente, essa característica teve nova interpretação. Em contrapartida, a lectina foi capaz de potencializar a síntese de anticorpos anti-OVA do tipo IgM anti-OVA em níveis significativamente mais elevados do que OVA pura ou associada ao adjuvante. Conforme discutido anteriormente, essa particularidade também foi observada com relação à síntese de IgG e IgM específicas para LLP, fato que favorece o mecanismo de ação predominante da lectina, seja na indução de anticorpos específicos anti-LLP dos tipos IgG e IgM anti-LLP, ou seja potenciando a secreção de anticorpos anti-OVA.

Os resultados até aqui discutidos indicam que LLP e  $Al(OH)_3$ , através de diferentes mecanismos de ação, aparentemente induzem resposta imunológica humoral que reflete o padrão de atividade de linfócitos Th2. Com o intuito de reforçar essa possibilidade, foi analisada, através de PCA, a presença de IgE específica para OVA nos soros de camundongos imunizados com soluções dessa proteína (Figura 14). Os animais imunizados com OVA-LLP alcançaram na resposta secundária títulos de IgE semelhantes ao induzidos por  $Al(OH)_3$ , já conhecido por elicitar reações de hipersensibilidade I. Embora tenham proporcionado alterações na cinética de IgE, aos carboidratos injetados com LLP não chegaram a interferir com a ação da lectina, sugerindo que a alergenicidade de LLP pode estar relacionada a outros fatores, que não o mecanismo de interação a carboidratos. Apesar disso, esses dados constituem fortes indícios de que essa lectina estimula resposta imunológica do tipo Th2, que é caracterizada pela produção de títulos altos de IgE (MARCIANI, 2003).

Diante de evidências que apontam a relação entre a ação adjuvante de LLP e sua afinidade específica pelos açúcares D-glucose, D-manose e N-acetil-D-glucosamina, questiona-se os possíveis mecanismos pelos quais o processo ocorre. Tendo como base os conceitos de imunoestimulação relatados por SCHINGS (2000), alguns mecanismos distintos, não mutuamente exclusivos, podem ser considerados possíveis. Cogita-se inicialmente, que as lectinas imunogênicas glicosiladas podem apresentar resíduos de carboidratos conservados, que possivelmente sejam reconhecidos por receptores específicos



presentes em células fagocitárias. Dessa forma, o complexo antígeno-adjuvante liga-se aos receptores de reconhecimento padrão e elicitam eficiente endocitose receptor mediada e o processamento antigênico. Em outra abordagem, atribui-se ao dano molecular, que a lectina, direta ou indiretamente, possa induzir, papel sinalizador na expressão de moléculas co-estimulatórias a partir das células apresentadoras de antígeno, garantindo a imunogenicidade do antígeno. Esse paradigma firma-se no fato de que o sistema imune distingue o tecido danificado do tecido ileso, tal como o próprio do não próprio. Finalmente, é provável que a diferença fundamental entre a administração isolada do antígeno, resultando na baixa resposta imune, e a administração do antígeno associado ao adjuvante, é que nesse último caso ocorre indução de uma resposta inflamatória, uma vez que as diferentes citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- $\alpha$ ) produzidas por diferentes populações de macrófagos e outras células, com as quais o adjuvante pode interagir constituem elementos essenciais para a resposta imunológica específica.

A literatura vem atribuindo às lectinas vegetais, papel inibitório sobre o crescimento de microrganismos. Tal hipótese está associada à capacidade dessas proteínas, através da sua ligação com carboidratos, de interferir com a síntese e renovação do invólucro celular do microrganismo. De fato, algumas lectinas vegetais, nas quais foi estudada esta atividade, apresentaram efeito fungicida ou fungistático sobre leveduras e bolores patogênicos para plantas. Tem-se como exemplo, a aglutinina de *Urtiga dioica* (UDH), a WGA, a lectina de *Gastrodia elata* (GAFP-1) e a TEL (MELO *et al.*, 1997; VAN PARIJS *et al.*, 1992; CIPROAGA *et al.*, 1999; XU *et al.*, 1998; FREIRE *et al.*, 2002).

FREIRE *et al.*, (2002) demonstraram que TEL, uma lectina com massa molecular aparente de 40kDa, inibe o crescimento dos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *C. lindemuthianum* e *S. cerevisiae*, numa concentração de 280  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . No presente estudo, utilizando modelo experimental diferente, o efeito anti-fúngico dessa lectina foi avaliado contra o *Microsporum canis* e leveduras do gênero *Candida*. Como pode ser visto na Tabela 14, TEL, à partir da concentração de 125  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , inibiu o crescimento de 62% das cepas de *M.*

*canis*. Percebeu-se ainda que o crescimento do fungo tratado com essa lectina foi interrompido logo no primeiro dia de incubação, permanecendo quase que estável ao longo dos demais dias, demonstrando que o efeito da mesma foi independente do tempo de tratamento (Figura 15). Quanto às leveduras, estas não foram inibidas por TEL (resultados não mostrados).

LLP, tal como TEL, não interferiu no crescimento das leveduras, mas foi capaz de inibir, na concentração de  $250\mu\text{g.mL}^{-1}$ , o crescimento de 66% das cepas de *M. canis* (Tabela 19). Contrastando ao que foi observado com TEL, a cinética de crescimento do *M. canis* tratados com LLP apresentou aumento gradual ao longo dos dias refletindo a relação do efeito da lectina com o tempo de tratamento (Figura. Quando a atividade dessas lectinas sobre os fungos foi analisada nas concentrações de  $125\text{-}250\mu\text{g.mL}^{-1}$ , constata-se que, indiscutivelmente, TEL apresentou o melhor efeito antifúngico (Figuras 16 e 17). Alia-se a este, o fato dessa lectina ter demonstrando efeito independente, tanto com relação ao tempo como à dose .

Quanto ao extrato total de *L. purpureus*, este foi capaz de inibir o crescimento do *M. canis*, na concentração de  $1000\mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentado o melhor efeito antifúngico entre as lectinas estudadas, apesar disso, seu efeito antifúngico, nas concentrações de  $125\text{-}250\mu\text{g.mL}^{-1}$ , foi significativamente inferior ao de TEL . Dessa forma, conforme ilustram as Figuras 15, 16 e 17, a ação de ET sobre a cinética de crescimento do fungo foi influenciado pela dose e caracterizado por diferenças significativas em diversos pontos ao longo do tempo de observação; fato que indica a perda da ação antifúngica durante o período de tratamento. Esse comportamento pode ser justificado pelo alto teor protéico dessas sementes, que inclui, além da LLP, vários outros componentes que podem apresentar ação antifúngica acompanhada por instabilidade estrutural e/ou funcional frente às alterações de pH, temperatura e tempo. Nesse domínio, algumas pesquisas apresentaram resultados sobre as potencialidades das sementes de *Lablab purpureus*. FAKHOURY & WOLOSHUK (2001) demonstraram proteína inibidora de  $\alpha$ -amilase, com características hemaglutinantes, que interferiram no crescimento *in vitro* de *Aspergillus flavus*. Já YE *et al.*(2000), isolou proteína

quitina ligante, a qual denominou doliquina, dotada de efeito inibitório sobre os fungos *Fusarium oxysporum*, *Rhizotonia solani* e *Coprinus comatus*. Considera-se ainda resultados obtidos no nosso laboratório (LEOPOLDO et al., 1994) que isolaram dessas sementes, lectinas com especificidade para quitina, as quais não foram testadas quanto às suas possíveis propriedades antifúngicas.

Algumas hipóteses, não mutuamente exclusivas, foram levantadas para justificar diferentes atuações antifúngicas entre lectinas vegetais. Uma delas, menos provável, considera o tamanho da cadeia, relacionando o baixo peso molecular da lectina ao seu eficiente efeito fungicida, ou seja, quanto menor a lectina, melhor a capacidade de essa molécula interagir com os sítios ativos de morfogênese da parede celular (BROEKAERT et al., 1989). Essa possibilidade ainda não é suficiente para justificar os diferentes efeitos de TEL e LLP, dotadas de 2 e 4 subunidades com massas moleculares aparentes que somam 60 e 67kDa, respectivamente. Não obstante, as análises da seqüência NH<sub>2</sub> terminal dessas moléculas revelou que TEL (FREIRE et al., 2001), diferentemente de LLP (GOWDA et al., 1994), apresenta homologia com algumas proteínas de defesa de plantas. Além disso, está bem demonstrado na literatura que as diversas atividades biológicas exercidas pelas lectinas, inclusive seus efeitos sobre microrganismos, ocorrem em função do reconhecimento e interação entre essas moléculas e estruturas glicanas complexas presentes na estrutura do microrganismo. Assim, uma simples unidade monossacarídica, pertencente à estrutura, é reconhecida pela lectina e complexa-se com o seu sítio ativo. Vários polissacarídeos ( $\beta$ -1-3,  $\beta$ -6 glucan, glucomananas, galactomananas), alguns associados a polipeptídeos componentes das substâncias matriciais, e proteínas e glicoproteínas hidrofóbicas presentes em uma camada mais externa da superfície de dermatófitos. (KITAGIMA, 2001), podem interagir com a lectina através de ligações hidrofóbicas e eletrostáticas que não estão localizadas nos sítios de ligação a carboidrato, mas que estabilizam a ligação e desempenham papel fundamental no seu mecanismo de ação. Portanto, é evidente que cada lectina apresente uma maneira específica de associar-se com seus ligantes, e estas



diferenças estão relacionadas com o sítio de ligação a carboidratos e possivelmente ao seu mecanismo antifúngico

Nesse estudo, foi abordada a possibilidade da fração purificada da lectina terem exercido efeito antifúngico através de ligação com receptores glicídicos presentes na estrutura do *Microsporium canis*. Com tal perspectiva, essa proteína foi pré-incubada com os açúcares N-acetil-D-glucosamina, D-glucose e D-manose, antes de serem inoculados com *M. canis*. Conforme demonstra a Figura 18, o tratamento da lectina com os açúcares aboliram a atividade anti-fúngica das amostras testadas. Esses resultados podem ser entendidos como expressão do padrão de afinidade dessa lectina por D-glucose e D-manose e demonstram que o efeito inibitório da lectina sobre o crescimento dos fungos pode estar associado à sua interação com esses monossacarídeos, estejam estes na forma de glicoproteínas, glicolipídios ou polissacarídeos de superfície. Convém ressaltar que alterações na composição de mananas da parede celular de dermatófitos já foram determinadas como alvo de ação de antimicóticos de uso clínico (MARES *et al.*, 2002). Não obstante, a ligação LLP-GlcNac foi aparentemente essencial para a atividade anti-fúngica de LLP, uma vez que esse açúcar apresentou efeito inibidor significativamente melhor do que os demais, tanto com relação à lectina como ao extrato protéico das sementes.

Esses resultados vão ao encontro de evidências bioquímicas que implicam as ligações da lectina às unidades monossacarídicas como elementos-chave para seus efeitos biológicos e para a importância da quitina, polímero de N-acetil-D-glucosamina, para a rigidez da parede e para o equilíbrio do crescimento do fungo em meio aquoso, uma vez que é o componente microfibrilante predominante da parede de dermatófitos, em detrimento de glucanas, presentes em menor quantidade.

Com achados semelhantes, pesquisadores atribuíram o mecanismo de ação anti-fúngico de lectinas vegetais, ligantes de GlcNac, à sua interferência na síntese de quitina, seja através de ação direta ou da indução de *crosslinking* entre as cadeias (BROEKAERT *et al.*, 1989). Essas suposições foram ainda reforçadas por estudos desenvolvidos por CIPROAGA *et al.* (1999) que demonstraram que a

interação lectina-quitina pode desestruturar a estabilidade da relação entre hidrólise e síntese do invólucro celular e comprometer, não só o crescimento do tubo germinativo, como também o compartimento interno da célula, ocasionando intumescência e vacuolização do conteúdo celular.

A investigação do efeito inibitório da lectina e do extrato total sobre o *M. canis*, incluiu ainda o tratamento de pêlos artroconidiados, obtidos de animais infectados. Essas amostras foram pré-incubadas com soluções de LLP e de ET, e o crescimento do fungo foi avaliado ao longo de 21 dias. Embora nesse modelo não tenha sido calculada a concentração inibitória mínima, foi possível observar que tanto LLP como ET inibiram o crescimento do *M. canis* (Figura 19). O achado de que a forma parasitária desse patógeno, considerada estrutura de maior rigidez e resistência (KITAGIMA, 2000; KANO *et al.*, 2001; RASHID, 2001), é susceptível a ação da lectina reforça a hipótese de que a interação da lectina com a quitina é fundamental para que ocorra a inibição do crescimento do fungo.

A ineficiência das lectinas estudadas frente às leveduras pode ser atribuída, em parte, à composição estrutural da parede celular desses organismos que, quando comparada à dos fungos filamentosos, é caracterizada pela menor quantidade de quitina (OSUME, 1997). É também possível considerar, que aspectos do metabolismo e crescimento, peculiares de cada um dos organismos: *Candida spp.* e *Microsporium canis*, impliquem em distintos mecanismos de interação entre receptores glicoconjugados, presentes na sua estrutura, e lectinas, que em primeira análise são traduzidos pela susceptibilidade ou resistência dos fungos à ação dessas proteínas.

As figuras 20, 21 e 22 demonstram que LLP conjugada à FITC não marcou a estrutura externa das espécies de *Candida* (Figura 20C) e nem dos artroconídios e macroconídios de *M. canis* (Figuras 21B e 22B). Por outro lado, TEL confirmou sua melhor eficiência sobre fungos, aglutinando e marcando, de forma inespecífica, a superfície das diferentes espécies de leveduras (Figura 24-A), como também as estruturas estudadas de *M. canis*: artrosporos (Figura 21C-D e Figura 26B). Essas observações sugerem que cada lectina apresenta uma maneira própria de associar-se à estrutura dos fungos, e estas diferenças podem

envolver além do sítio de ligação a carboidratos, que são abundantes e variados na parede fúngica, outras formas de interação que, mesmo estabilizando a ligação, ainda não são suficientes para inibir o crescimento do fungo em meio de cultura *in vitro*.

A eficácia de TEL como molécula marcadora foi consistente com achados de outros pesquisadores, que observaram em provas histoquímicas a viabilidade do uso de lectinas fluoresceinadas, seja para identificar e localizar, através da microscopia luminosa, glicoconjugados específicos na superfície dos fungos, seja para detectar esses organismos em amostras clínicas obtidas do homem e de animais domésticos (SLIFKIN & DOYLE, 1990).

Este trabalho apresenta os primeiros resultados que demonstram a ação antifúngica de lectinas de *Lablab purpureus*, como também é o pioneiro na abordagem dos efeitos de lectinas vegetais sobre o *Microsporum canis*. Com relação à *Candida*, a utilização dessas proteínas tem sido largamente citada na literatura (ALVIANO *et al.*, 1999; SOARES *et al.*, 2000; LOYOLA *et al.*, 2002), sobretudo por pesquisadores que, para o entendimento da patogênese ou para fins taxonômicos, utilizaram uma variedade de aglutininas vegetais em investigações sobre a estruturação molecular da parede de leveduras. Todavia, ao nosso conhecimento, poucos são os relatos que abordaram o efeito inibidor de lectinas sobre o crescimento desses fungos.

Os valores das concentrações inibitórias mínimas de LLP e TEL estão acima daqueles recomendados pelo NCCLS para testes de inibição com drogas de uso clínico, sobretudo da griseofulvina, eficaz na concentração de  $2\mu\text{g.mL}^{-1}$  e estabelecida como antimicótico de primeira linha para dermatofitose (JESSUP *et al.*, 2000). Apesar disso, acredita-se que a adaptação do modelo de inibição de crescimento de fungos filamentosos recomendado pelo NCCLS foi eficiente para avaliar os efeitos dessas lectinas sobre o *M. canis* e abrir perspectivas para a realização de novas investigações, com abordagem clínica e terapêutica, que utilizem essas proteínas em conjugação com outras drogas, aproveitando as suas potencialidades para formar glicoconjugados solúveis e atuar como mísseis biológicos.



## 6 CONCLUSÕES

---

- As sementes de *Lablab purpureus* apresenta a lectina, com afinidade para ovalbumina-sepharose , com cinco bandas protéicas, cada uma com massa molecular aparente variando entre 10 e 22 kDa;
- A lectina de *Lablab purpureus* foi imunogênica para a síntese de anticorpos específicos e esse efeito foi dependente da dose e da presença de monossacarídeos específicos. O padrão isotópico desses anticorpos refletiu tanto o envolvimento de linfócitos T, possivelmente voltado para subpopulações Th2, como a ativação policlonal de linfócitos B;
- LLP exerceu ação imunoadjuvante da resposta humoral dirigida contra a ovalbumina. Esse efeito expressou o mecanismo de ação predominante da lectina, uma vez que apresentou a mesma relação com domínios de reconhecimento de carboidratos e o mesmo padrão isotópico dos anticorpos produzidos contra LLP;
- A lectina de *Talisia esculenta* e o extrato total e lectina de *Lablab purpureus* apresentaram efeitos inibitórios sobre o *M. canis*. A menor concentração inibitória mínima foi obtida com TEL;
- Os efeitos inibitórios de ET e LLP sobre o crescimento de *M. canis* foram significativamente afetados pela ação de carboidratos, sobretudo de N-acetil-D-glucosamina. Esses dados constituem fortes indícios de que o mecanismo de atuação da mesma está associado à sua interação com esses açúcares presentes na superfície desse organismo.

- O efeito inibidor do ET e de LLP sobre o crescimento de *M. canis* foi efetivo a partir do tratamento de pêlos artrosporados de animais com essa lectina;
- TEL, ao contrário de LLP, foi eficiente em marcar a superfície de *Candida* e de artrosporos e macroconídios de *M. canis*

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A .H., POBER, J. S.. **Cellular and molecular immunology**. 5<sup>A</sup> edition. Revinter, pp 544, 2004.
- ADAMS, D.D. Molecular interactions in macrophages activation. **Immunol Today**., v. 10, 33, 189.
- AGUADO, C., RUÍZ-HERRERA, J., IRANZO, M., SENTANDREU, R. AND MORMENEO, S.. Reaggregation and binding of cell wall proteins from *Candida albicans* to structural polysaccharides. **Institut Pasteur/ Elsevier**, v. 149, p. 327-338, 1998.
- ALENCAR, N.M.N., TEIXEIRA, E.H., ASSREUY, M.A.S., CAVADA, B.S., FLORES, C. A., RIBEIRO, R.A. leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediators Inflamm**, v. 8, 107-113, 1999.
- ALENCAR, N.M.N., TEIXEIRA, E.H., ASSREUY, M.A.S., ALENCAR, V.B.M., CAVADA, B.S., MELO, S.C., RAMOS, M.V., CUNHA, F.Q., RIBEIRO, R.A. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces in vivo neutrophil migration by indirect mechanism. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, p. 1674-1681, 2003.
- ALBUQUERQUE, D.A., MARTINS, G.A., CAMPOS-NETO, A., SILVA, J.S.. The adjuvant effect of jacalin on the mouse humoral immune response to trinitrophenil and *Trypanosoma cruzi*. **Immunology Letters**. 68, p. 375-381, 1999.
- ALLEN, A.K., DESAI, N.N., NEUBERGER, A. Purification of glycoprotein lectin from broad bean (*Vicia-fava*) and a comparison of its properties with lectins of similar specificity. **Biochem**. v. 155, 127-135, 1976.



- ALVIANO, C.S., TRAVASSOS, L. R., SCHAUER, R. . Sialic acids in fungi: A minireview. **Glycoconjugate**. 16 (9), p. 545-554, 1999.
- ANDRADE, J.L., ARRUDA, S., BARBOSA, T., PAIM, L., RAMOS, M.V., CAVADA, B.S. and BARRAL-NETO, M. Lectin-induced nitric oxide production. **Cell Immunol**, v. 194 (1), 98-102, 1999.
- ARAGÃO, M.E.F. Proteínas de *lablab purpureus* (L.) Sweet: Estudo da atividade hema glutinante e da alergenicidade. **Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 1990.**
- ASSREUY, M.A.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 plant lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators Inflamm**, v. 6, 201-210, 1997.
- ASSREUY, M.A.S., ALENCAR, N.M.N., CAVADA, B. S., CALVETE, J.J., CUNHA, F. Q. and RIBEIRO, R.A. Pró-inflammatory effect induced by spermadhesin PSPI/PSPII. **Eur. J. Biochem**, 2001
- ASSREUY, M.A.S., MARTINS, G.J., MOREIRA, E.E.F., BRITO, G.A.C., CAVADA, B.S., RIBEIRO, R.A., FLORES, C.A. Prevention of Cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. **J. Urol**. v. 161, p.1988-1993, 1999.
- AUDBERT, F.. Adjuvants for vaccine, a quest. **Internacional Immunopharmacology**. 3, p. 1187-1193, 2003.
- BABA, K., OGAWA, M., NAGANO, A., KURODA, H., SUMIYA, K., 1991. Development changes in the bark lectins of *Sophora japonica*. **Planta** 181, 462-470.

- BAETHGEN, W.E., ALLEY, M.M.. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldahl digests. **Soil Science**, v. 20, p. 961-969, 1989.
- BARKAI-GOLAN, R., MIRELMAN, D. and SHARON, N. Studies on growth inhibition by lectins of penicillia and aspergilla. *Arch. Microbiol.*, v. 116, p. 119-124, 1978.
- BARBIERI, L., FALASCA, A., FRANCESCHI, C., LICASTRO, F., ROSSI, C.A., STIRPE, F. Purification and properties of 2 lectins from the látex of the Euphorbiaceae plants *Hura-crepitans* (sand-box tree) and *Euphorbia-characias* L. (Mediterranean spurge). **Biochem. J.** 215, 433-439, 1983.
- BARONDES, S.H., COOPER, D.N.W., GITT, M.A. Galectins. Structure and functions of a large family of animal lectins. **J. Biol. Chem.** V. 269, 20807-20810, 1994.
- BARRAL-NETO, M., SANTOS, S.B., BARRAL, A., MOREIRA, L.I.M., SANTOS, C.F., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, J.T.A. and CAVADA, B.S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleae tribe. **Immunological Invest.**, v.21 (4), 297-303, 1992.
- BARRAL-NETO, M., VON SOHSTEN, R.L., TEIXEIRA, M., CONRADO DOS SANTOS, W.L., POMPEU, M.L., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, J.T.A., CAVADA, B.S., FALCOFF, E., BARRAL, A. In vivo protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta Tropica**, v. 60, p. 237-250, 1996.
- BARRETT, D. From natural products to clinically useful antifungals. **Rev. Biochimica et Biophysica Acta.** v. 1587, 224-233, 2002.
- BARTNICKI-GARCIA, S. Fundamental aspects of hyphal morphogenesis Symp. **Soc. Microbiol.**, v.23, p. 245-267, 1973.

- BARTNICKI-GARCIA, S. cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. **Ann. Ver. Microbiol.**, v.22, p. 87-107, 1968.
- BAUHMANN, H. & GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunol today**, v. 15 (2), 74-80, 1994.
- BECKER, J. W., REEKE, G.N., WANG, J.L., CUNNINGHAM, B.A., and EDELMAN, G.M. The covalent and three-dimensional structure of concavalin A. III. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides. **J. Biol. Chem.**, 250, 1513-1524, 1975.
- BEINTEMA, J.J. Structural features of plant chitinases and chitin-binding proteins. **FEBS Lett.** 350, 159-163, 1994.
- BEN-JOSEF, A.M., CUTRIGHT, J.L., MANAVATHU, E.K., SOBEL, J. D. CAN-296-P is effective against cutaneous candidiasis in guinea pigs. **Int. J. Antimicrobial Agents**, v.22, 168-171, 2003.
- BENTO, C.A.M., CAVADA, B.S., OLIVEIRA, J. T.A., MOREIRA, R.A., and BARJA-FIDALGO. Rat paw edema and leukocyte emmigration induced by plant lectins. **Agents Actions**, v. 38, 48-54, 1993.
- BLASCO, E., BARRA, A., NICOLAS, M., LECRON, J. C., WIJDENES, J. and PREUDHOME, J. L. Proliferative response of human CD4+ T lymphocytes stimulated by the jacalin. **Eur. J. Immunol**, v. 25, 2010-2018, 1995.
- BLUM, H., BEIER, H., and GROSS, H. J., 1987. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis** 8, 93-99, 1987.
- BOYD, W.C. & SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, v. 119, p.419, 1954.



- BOUCHARA, J.P. TRONNCHIN, G. Adhesion and pathogenicity in *Aspergillus* infections. **Medical Maladies Infección** . 29 (11), p. 705-711, 1999.
- BOURNE, Y., MAZURIER, J., LEGRAND, D., ROUGE, P. MOTREUIL, J., SPIK, G. and CABBILLAU, C. Structure of a legume lectin complexed with the human lactotransferin N2 fragment, and with an isolated biantennary glycopeptide: role of the fucose moiety. **Structure**, v. 2, 209-219, 1994.
- BOURNE, Y., ROUGE, P. and CABBILLAU, C. X-ray structure of a biantennary octasaccharide-lectin complex refined at 2.1 Å resolution. **J. Biol. Chem.** v. 267 (1), 197-203, 1992.
- BRILHANTE, R.S.N., CAVALCANTE, C.S.P., SOARES-JUNIOR, F.A., CORDEIRO, R.A., SIDRIM, J.J.C. and ROCHA, M.F.G. High rate of *Microsporum canis* feline and canine dermatophytoses in Northeast Brazil: Epidemiological and diagnostic features. **Mycopathologia**, v. 156, 303-308, 2003.
- BROEKAERT, W. F. PEUMANS, W. J. Lectin release from seeds of *Datura stramonium* and interference of the *Datura stramonium* lectin with bacterial motility. In: TC Bog-Hansen, e Van Driessche, eds, Lectins, Biology, biochemistry, **Clinical Biochemistry**, v. 5. Walter de Gruyter. Berlin, 57-65, 1996.
- BROEKAERT, W. F., PARIJS, J.V., LEYNS, F., JOOS, H., PEUMANS, W. J. A chitinbinding lectin from stinging nettle rhizomes with antifungal properties, **Science** 245, 1100-1102, 1989.
- BROOKS, A.S.; LEATHEM, A.J.C., SCHUMACHER, U. L. An introduction of the field. In: Brooks, A, S.; Leathem, A.J.C., Schumacher, U.L (Eds). Lectin Histochemistry: a concise practical handbook. Bios Scientific Publishers Ltd, Oxford, UK pp. 1-17, 1997.

- CAMPOS, M.M. Efeito de canatoxina sobre células em cultura. **Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Fluminense, Niterói-Rj, 1990.**
- CANTÓN, E., PEMÁN, J., VIUDES, A., QUINDÓS, G., GOBERNADO, M., ESPINEL-INGROFF, A. Minimum fungicidal concentrations of amphotericin B for bloodstream *Candida* species. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 45, 203-206, 2003.
- CARRINGTON, D.M., AUFFRET, A., HANKE, D.E., Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of Concanavalin. A. **Nature**, 313, 64-67, 2001.
- CARROLL, M.C. and PRODEUS, A.P. Linkages of innate and adaptive immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 10, 36-40, 1998.
- CAVADA, B. S., SANTOS, C. F., GRANJEIRO, T. B., NUNES, E. P., SALES, P.V.P., RAMOS, R.L., DE SOUZA, F.A.M., CRISOSTOMO, C.V., CALVETE, J.J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. **Phytochemistry**. 49, 675-680, 1998.
- CAVADA, B.S., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, R.A. and GRANGEIRO, T.B. Primary structures and functions of plant lectins. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 5, p. 193-201, 1993.
- CIOPROAGA, J., GOZIA, O., TUDOR, R., BREZUICA, L., DOYLE, R.J. *Fusarium* sp. Growth inhibition by wheat germ agglutinin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1428, p. 424-432, 1999.
- COSTA, J.J. and GALLI, S.J. Mast cells and basophils. Em: RICH, R., FLEISHER, T.A., SCHWARTZ, B.D., DHEARER, V.V.T. and STROBER, W. (ed.) **Clinical Immunology: Principles and Practice**. St. Louis, Mosby-year book Inc., 408-430, 1998.



- COSTA, J.J., WELLER, P.F., and GALLI, S.J. Células da Resposta Imunológica. **JAMA Brasil**, v. 5 (2), p. 768-778, 1997.
- COX, J.C. & COULTER, A.R. Adjuvants- a classification and review of thier modes action. **Vaccine**, v. 15, p. 248-256, 1997.
- CRONSTEIN, B.N. and WEISSMAN, G. The adhesion molecules of inflammation. **Arthritis RheumN**, v. 136, p. 147-157, 1993.
- CHRISPEELS, M.J., RAIKHEI. Lectins, lectin genes and their role in plant defence. **Plant Cell**, v. 3, p. 1-19, 1991.
- CUNHA, F. Q., FERREIRA, S. H. The release of a neutrophil factor from peritoneal macrophage by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 129, n. 1-2, p. 65-76, 1986.
- 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**, v. 19 (2), p. 109 –113, 2000.
- DATRY, A., THELLIER, M. Biology and pathogenicity of fungi. **La revue du praticien**. v. 51, 7, p. 713-718, 2001.
- DATTA, P.K., FIGUEROA, M.O.R., LAJOLO, F.M.. Chemical modification and sugar binding-properties of 2 major lectins from pinhão (*Araucaria brasiliensis*) seeds. **J. Agric. Food. Chem**, v. 41, p. 1851-1855, 1993.
- DAVIES, G.. OM-174 and OM-triacly adjuvants maturation of dendritic cells in vitro and in vivo. **Vaccine**, v. 21, p. 3504-3505, 2003.



- DeBOER, D.J., MORIELLO, K.A. Investigations of a killed dermatophyte cell-wall vaccine against infection with *Microsporum canis* in cats. *Res. Veterinary Science*, v. 59, p. 110-113, 1995.
- DEBRAY, H., DECOU, D., STRECKER, G., and MONTREUIL, J. Specificity of twelve lectins toward oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. *Eur. J. Biochem.*, v. 117, p. 41-55, 1981.
- DESREUMAUX, P. 7 CAPRON, M. Eosinophils in Allergic reactions. *Curr. Opin Immuno*, v. 8, p. 790-795, 1996.
- DEVRIES, M.E., RAN, I. and KELVIN, J. D. On the edge: The physiological and pathophysiological role of chemokines during inflammation and immunological responses. *Seminars In Immunology*, v. 11, 95-104, 1999.
- DIXON, T. *Australas. Med. Gaz*, v. 6, p. 137-138, 1887, citado por Kocourek 1987.
- DRICKAMER, K. and TAYLOR, M.E. Biology of animal lectins. *Annu. Ver Cell Biol*, v. 9, p. 237-264, 1993.
- DRICKAMER, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J. Biol. Chem.* v. 239, p. 9557-9560, 1988.
- DUARTE-ESCALANTE, E., ZENTENO, E., TAYLOR, M. L. Interaction of histoplasma capsulatum yeasts with galactosylated surface molecules of murine macrophages. *Archives of Medical Research*, v. 34, p. 176-183, 2003.
- DUBOIS, M., GILES, K. A., HAMILTON, J. K. and REBERS, P. A. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal Chem*, v. 28: p. 350-6, 1956.

- DUEK, L., KAUFMAN, G., ULMAN, Y. and BERDICEVSKY, I. The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections. **J. Infection**, v. 48, 2, p. 175-180, 2004.
- EDELMAN, G.M. and WANG, J.L. Binding and functional properties of concanavalin A and its derivatives. III. Interactions with indoleacetic acid and other hydrophobic ligands. **J. Biol. Chem**, v. 253, p. 3016-3022, 1978.
- EINHOFF, W. & RUDIGER, H. Leguminous glycosidases: hydrophobic and lectin binding properties. **Phytochemistry**, v. 28, p. 355-357, 1989.
- ELFSTREND, M. IN R. Kbert Ed. **Gorberschorfer Veröffentlichungen**, 1-159, Engen, Stuttgart, citado por Gold and Balding, 1975, 1897.
- ENGERS, H., KIENY, M.P., PAULE, M., MALHOTRA, P. & PINK, J.R.. Third meeting on novel adjuvants currently in or close to clinical testing world health Organization – Organisation Mondiale de la Santé, Fondation Mérieux, Annecy, France , 7-9 january 2002. **Vaccine**,v. 21, p. 3503-3524, 2003.
- EPPIHIMER, M.J., WOLITZKY, B., ANDERSON, D.C., LABOW, M.A. and GRANGER, D.N. Heterogeneity of expression of E-and P-selectins *in vivo*. **Circ. Res.** v. 79, 560-569, 1996.
- ETZLER M.E., BORREBAECK, C. Carbohydrate binding activity of a lectin-like glycoprotein from stem and leaves of *Dolichos biflorus*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 96, 92-97, 1980.
- ETZLER, M.E. Distribution and function of plant lectins. In: **The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine**. LIENER, I.E., SHARON, N. and GOLDSTEIN, I.J., ORLANDO, F.L. Academic Press, p. 371-435, 1986.



- FACCIOLI, L. H., SOUZA, G.E.P., CUNHA, F.Q., POOLE, S. and FERREIRA, S.H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration in vivo by indirect mechanism. **Agents Actions**, v. 30, p. 344, 1990.
- FARR, A.G., ANDERSON, S.K., BRADDY, S.C. and MEJINO, JR, J.L.V. Selective binding of dolichos bifloris agglutinin to L3T4, LYT-2 – Thymocytes. **J. Immunology**, v. 140, p. 1014-1021, 1988.
- FAKHOURY, A.M. & WOLOSHUK, C. P. Inhibition of growth of *Aspergillus flavus* and fungal  $\alpha$ -amylases by a lectin-like protein from *Lablab purpureus*. **Molecular Plant –Microbe Interactions**, v. 14 ( 8), p. 955-961, 2001.
- FAVERO. J., MIGUEL F., DORNAND, J., JANICOT, M., MANI, J.C. Dolichos lablab agglutinin: a potent T lymphocit mitogen and a ligh interleukin-2 promoter; In: **Lectins. New York: Walter de Gruyter, vol. 5**, 1986.
- FAVERO, J., MIGUEL F., DORNAND, J., MANI, J.C. Determination of mitogenic properties and lymphocyte target sites of Dolichos lablab lectin (DLA): comparative study with concanavalin A and galactose oxidase cell surface receptors. **Cell Immunol.**, 112: 302-314, 1988.
- FRAUWIRTH, K.A. & ROCHESE, F.. The role of B7 costimulation in T-cell immunity. **Immunol. Cell. Biol.** 77, p. 304-311, 1999.
- FREIER. T., FLEISCHMANN, G., RUDIGER, H. Affinity chromatography on immobilized hog gastric mucin and ovomucoid. A general method for the isolation of lectins. **Biol. Chem. Hoppe seyler**, v.366, p. 1215-1223, 1995.
- FREIRE, M.G.M, GOMES, V.M., CORSINI, R.E., MACHADO, O.L.T., DE SIMONE, S.G., NOVELHO, J.C., MARANGONI, S., MACEDO, M.L.R. Isolation and partial characterization of novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. **Plant Physiol. Biochem.**, v. 40, p.61-68, 2002.



- FREIRE, M.G.M, GOMES, V.M., MACHADO, O.L.T., SMOLKA, M.B., MARANGONI, S., NOVELHO, J.C., MARANGONI, S., MACEDO, M.L.R. Isolation and characterization of isolectin from *Talisia esculenta* seeds. **Journal of Protein Chemistry.**, v. 40, p.61-68, 2001.
- FREIRE, M.G.M, DESOUSA, I.A, SILVA, A.C.M, LIMA, TAMASHIRO, W.M.S.C, ANTUNES, E., MARANGONI, S. Inflammatory responses induced by *Talisia esculenta* seeds lectin in mouse. **Toxicon.**, v. 40, p.61-68, 2003.
- FRIES, J.W., WILLIAMS, A.J., ATKINS, P.C., NEWMAN, W., LIPSCOMB, M.F. and COLLINS, T. Expression of VCAM-1 and E-selectin in an in vivo modal endothelial activation. **Am. J. Pathol.**, v. 143, p. 725-737, 1993.
- GARCIA, M.L., HERRERAS, J.M., DIOS, E., ARGUESO, P., ALMARAZ, A. Evaluation of lectin staining in the diagnosis of fangal keratitis in an experimental rabbit model. **Molecular Vision**, v. 8, p. 10-16, January, 25, 2002.
- GATEHOUSE, A.M.R., BARBIERI, L., STIRPE, F., CROY, R.R.D. Effects of ribosome inactivating proteins on insect development – differences between *Lepidoptera* and *Coleoptera*. **Entomol. Exp. Appl.**, v. 54, p. 43-51, 1990.
- GATNER, F., LEIST, M., KUSTERS, S., VOGT, K., VOLK, H. D. and TIEGS, G.T. Cell stimuli-induced crosstalk between lymphocytes and liver macrophages results in augmented cytokine release. **Exp. Cell Res.**, v. 229, 137-146, 1996.
- GIORDANI, R., TREBAUX, J., MASI, M., REGLI, P. Enhanced antifungal activity of ketoconazole by *Euphorbia characias* latex against *Candida albicans*. **J. Ethnopharmacology**, v. 78, p. 1-5, 2001.
- GLENNY, A.T., POPE, C.G. & WALLACE W.H.. The antigen value of toxoid precipitated by potassium alum. **J. Pathol. Bacteriol**, v. 29, p. 38-39, 1926

- GOLDSTEIN, I. J., HOLLERMA, C. E., SMITH, E.E. Protein-carbohydrate interaction  
2. Inhibition studies on interaction of concanavalin. A with polysaccharides.  
**Biochemistry**, v.4, p. 876-880, 1965.
- GOLLAPUDI, V.S.S. & KIND, L.S. enhanced of reaginic antibody formation in the  
mouse by Concanavali A. **Inter. Archs. Allergy appl. Immunol.**, v.48, p.94-  
100, 1975.
- GOMES, J.C., FERREIRA, R.R., CAVADA, B.S., MOREIRA, R.A. and OLIVEIRA,  
J.T.A. Histamine release induced by glucose (mannose) specific lectins  
isolated from Brazilian beans: comparison with concanavalin A. **Agents  
Actions**, v. 41, p. 132-135, 1994.
- GORDON, J.R. & GALY, S. Mast cells as a source of both preformed and  
immunologically inducible TNF-cachectin. **Nature**, v. 346, p. 274-276, 1990.
- GOWDA, L.R., SAVITHRI, H.S., RAO, D.R..The complete primary structure of a  
unique mannose-glucose specific lectim from field bean (*Dolichos lablab*).  
**J.Biol. Chem.**, 269, 18789-18793, 1994.
- GOZALBO, D., ELORZA, M.V., SANJUAN, R., MARCILLA, A., VALENTIN, E.,  
SENTADREU, R. Critical steps in fungal cell wall sythesis: strategies for their  
inhibition. **Pharmac. Ther.**, v. 60, p. 337-345, 1993.
- GRANT, G..Plant Lectins. In: **Secondary Plant Products – antinutritional and  
beneficial actions in animal feeding**. Nottingham University Press, 1<sup>a</sup> ed., p.  
129, 1999.
- GRUNIG, G., BANZ, A., MALEFYT, R.W.. Molecular regulation of Th2 immunity by  
dendritic cells. **Pharmacology & Therapeutics**, *in press*, 2004.



- GUARRO, J., AGUILAR, I., LLOP, C., FERNÁNDEZ-BALLART, J. Inoculum preparation for in-vitro susceptibility testing of filamentous fungi. **J. Antimicrobial Chemotherapy**, v. 42, 3, p. 385-387, 1998.
- GUILLOT, J.M., SCANDARIATO, M. and COULET, M. Essai d'application du pouvoir agglutinant des lectines a l etude du genre *Candida*. **Ann. Microbiol.**, v.125, p. 189-500, 1974.
- GURAN, A., TICHÁ, M., FILLKA, K., KOCOUREX, J. Isolation and properties of a lectin from the seeds of the indian bean lalab (*Dolichos lablab*). **Biochem. J.**, v. 209, p. 653-657, 1983.
- HAMER, J.E. and HOLDEN D.W. Linking approaches in the study of fungal pathogenesis: a commentary. **Fungal Genetics and Biology**, v. 21, p. 11-16, 1997.
- HARDMAN, K.D., AGARWAL, R.C. and FREISER, M.J. Manganese and calcium binding sites of Concanavalin A. **J. Mol. Biol.**, v. 157, p. 69-89, 1982.
- HOLGATE, S.T., ROBINSON, C. and CHURCH, M.K. Mediators of immediate hypersensitivity. Em: MIDDLETON, E. J. R., REED, C.E., ELLIS, E.F., ADKINSON, N.F., YUNGINGER, J. W. and BUSSE, W. V.V. eds. **Allergy: Principles and Practice**. 4<sup>th</sup>, ed. St. Louis, Mo: Mosby – Year Book Inc., 267-301, 1993.
- HOPKINS, S.J. HUMPHRE, S.M., KINNAIRD, A., JONES, P.A. and KIMBE,I. Production of interleukin-1 by draining lymph node cells during induction phase of contact sensitization in mice. **Immunology**, v. 71. p. 403-496, 1990.
- IRAZOQUI, F.J.; LOPEZ, P.H.H.; MANDEL; U., NORES. G.A.. Influence of terminal residue on adjacent disaccharide immunogenicity. **Molecular Immunology**, v. 38, p.825-831, 2001.



- JESSUP, C.J., WARNER, N., ISHAM, N., HASAN, I. and GHANNOUM, M.A. Antifungal susceptibility testing of dermatophytes: establishing a medium for inducing conidial growth and evaluation of susceptibility of clinical isolates. **J. Clinical Microbiology**, v., p.341-344, 2000.
- JONES, H.E. Factors involved in producing a sustained experimental dermatophyte infection (*Trichophyton mentagrophytes*. *Cutis*; **Cutaneous Medicine for the Practitioner**, v. 67( 5), p. 18-19, may, 2001.
- KABIR, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. **Journal of Immunological Methods**, v. 212, p. 193 - 211, 1998.
- KALTNER, H. & STIERSTORFER, B.. Animal lectins as cell adhesion molecules. **Acta Anatomica**, v. 161, p. 162-179, 1998.
- KANO, R., AIHARA, S., NAKAMURA, Y., WATANABE, S., HASEGAWA, A. Chitin synthase 1 (Chs 1) gene sequences of *Microsporium equinum* and *Trichophyton equinum*. **Veterinary Microbiology**, v. 78 (1), p.85-90, jan. 2001.
- KANSAS, G. S. Selectins and their ligands: Current concepts and controversies. **Blood**, v. 88: p. 3259 - 3287, 1996.
- KARAYANNOPOULOU, G., WEISS, J. and DAMJANOV, I. detection of fungi in tissue sections by lectin histochemistry. **Arch. Pathol. Lab. Med**, v.112, p. 746-748, 1988.
- KARIBA, R.M., SIBOE, G.M., DOSSAJI, S.F. *In vitro* antifungal activity of *Schizozygia coffaeoides* Bail. (*Apocynaceae*) extracts. **J. Ethopharmacology**, v. 74, p. 41-44, 2001.

- KELM, S., SCHAUER, R. and CROCKER, P. R. The sialoadhesins – a family of sialic acid-dependent cellular recognition molecules within the immunoglobulin superfamily. **Glycoconj.**, v.13, p. 913-926, 1996.
- KENNEDY, J.F., PALVA, P. M. G., CORELLA, M.T.S., CAVALCANTI, M.S.M., COELHO, L.C.B.B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polym**, v. 26, p. 219-230, 1995.
- KENSIL, C.R.. QS-21 formulations and derivatives influence on innate and adaptative immunity. **Vaccine**, v. 21, p. 3503, 2003.
- KILPATRICK, D. C. Mechanisms and assessment of lectin-mediated mitogenesis. **Molecular Biotechnology**, v. 11: (1), p. 55 – 65, 1999.
- KITAJIMA, Y. Ultrastructure and molecular biochemistry on pathogenic fungal cells: the architecture of septal cell walls of dermatophytes. **J. Medical Mycology**, v. 42, 2, p. 55-59, 2001.
- KLEIN, A., CUNHA, F.Q. and FERREIRA, S.H. The role of lymphocytes in the neutrophil migration induced by ovalbumin in immunized rats. **Immunology**, v. 84, p. 577-584, 1995.
- KOENIG, H. **Guide de Mycologie Médicale**. Paris: édition marketing S.A., 1995.
- KOJIMA, K., MATSU-URA, Y., OGAWA, H., SENG, N., MATSUMOTO, I., 1994. Detection of a lectin activity in plant bark extracts: solid phase assay involving horseradish peroxidase-conjugated glycoproteins. **Plant Physiol. Biochem**, v. 32, p. 217-224, 1994.
- KOCOUREK, J. Historical Background in LIENER, I.J.; SHARON, N. & GOLDSTEIN, I.J: eds **The Lectins**. Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine. London, Academic Press, 3-32, 1986.

- KORTT, A.A., CALDWELL, J. B. Low molecular weight albumins from sunflower seeds: identification of a metronine rich albumin. **Phytochemistry**, v. 9, p. 2805-2810, 1990.
- KOTNIK, P.T., ERZEN,N.K., KUZNER, T.U. DROBINIC-KOSOROK, M.. Terbinaphine hydrochloride treatment of *Microsporum canis* experimentally inducing ringworm in cat . **Veterinary Microbiology**, v. 83; p. 161-168, 2001.
- KUMAR, N.S., RAO, D.R. . The nature of the lectins from *Dolichos lablab*. **J.Biosc.**, v.10: p.95-109, 1986.
- KRUG, G., ROGGENTIN, P., SCHAUER, R., BRASCH, J. Dermatophytes do not produce sialidase in vitro. **Mycoses**, v. 40, 1, p. 17-21, 1997.
- LAEMMLI, U. K.Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, v. 227: p. 680-685, 1970.
- LAVELLE, E. C., GRANT, G., PUSZTAI, A., PFULLER, U., O'HAGAN, D. T. Mucosal immunogenicity of plant lectins in mice. **Immunology**, v. 99, p. 30 – 37, 2000.
- LAVELLE, E. C., PUSZTAI, A., PFULLER, U., O'HAGAN, D. T.- The identification of plant lectins with mucosal adjuvant activity. **Immunology**, v.102: p.77 – 86, 2001.
- LEATHEM, A. J., BROOKS, S. A. **Light microscopy. Overview and basic methods. In: Lectins methods and protocols.** Ed. Rhodes, J. M. & Milton, J. D. Humana Press, Totowa, New Jersey, U. S. A., 1997.
- LEOPOLDO, P.T., XAVIER-FILHO, J., LIMA, M.S.. lectins of *Lablab purpureus* seeds. **Journal of Science Agric**, v. 65,p. 179-183, 1994.



- LIN, T.T. -S., LI, S.S., -L. Purification and physicochemical properties of ricins and agglutinins from *Ricinus communis*. **Eur. J. Biochem**, v. 105, p. 453-459, 1980.
- LIENER, I.E., SHARON, N. & GOLDSTEIN, I.J. **The lectins**. Properties, Functions And Applications In Biology And medicine, 600pp., Academic Press Inc., New York, 1986.
- LIS, H., SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chem. Rev.**, v. 98, p. 637-674, 1998.
- LORIS, R., HAMELRYCK, T., BOUCKAERT, J. and WYNS, L. Legume lectin structure. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1383, 9-36, 1998.
- LORIS, R., HAMELRYCK, T., BOUCKAERT, J., WYNS, L. Legume lectins structure. **Biochim. Biophys. Acta** 1383, 9-36, 1998.
- LOYOLA, W., GAZIRI, D.A., GAZIRI, L.C.J., FELIPE, I.. Concanavalin A enhances phagocytosis and killing of *Candida albicans* by mice peritoneal neutrophils and macrophages. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 33, p. 201-208, 2002.
- MACHUKA, J. S., VAN DAMME, ELS, J. M., PEUMANS, W.J., JACKAI, L. E.N. Effect of plant lectins on larval development of the legume pod borer, *Maruca vitrata*. **Entomol. Exp. Appl.** 93: 179-187, 1999.
- MAKELA, O. Studies in hemagglutinins of Leguminosae seeds. **Ann. Med. Exp. Biol.**, 35, 1-156, 1957.
- MANCIANTI, F., NARDONI, S., CORAZZA, M., D'ACHILLE P., PONTICELLI, C. Environmental detection of *Microsporium canis* arthrospores in the households of infected cats and dogs. **J. of Feline Medicine and Surgery**, v.5. 323-328, 2003.

- MANCIANTI, F., PEDONESE, F. MILLANTA, F. GUARNIERI, L. Efficacy of oral terbinafine in feline dermatophytosis due to *Microsporum canis*. **J. of Feline Medicine and Surgery**, v. 1, 37-41, 1999.
- MANSFIELD, M. A., PEUMANS, W. J., RAIKHEL, N.V. Wheat-germ agglutinin is synthesized as a glycosylated precursor. **Planta**, 173, 482-489, 1988.
- MAOZ, M., NEEMAN, I. Effect of *Inula viscosa* extract on chitin synthesis in dermatophytes and *Candida albicans*. **J. Ethnopharmacology**, v. 71, p. 479-482, 2000.
- MARCIANI, D.J.. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. **Therapeutic Focus**, v. 8 (20); p. 934-942, 2003.
- MARES D., ROMAGNOLI, C., TOSI, B., BENVEGNI, R., BRUNI, A. and VICENTINI, C.B. Mannan changes induced by 3-methyl-5-aminoisoxazole-4-thiocyanate, a new azole derivative, on *Epidermophyton floccosum*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 36, 47-57, 2002.
- MERZ, R.A., HORSCH, M., RUFFNER, H. P., RAST, D.M. Interaction between chitosomes and concanavalin A. **Phytochemistry**, v. 52, 211-224, 1999.
- MILAR, D.J., ALLEN, A.K., SMITH, C.G. Chitin-binding proteins in potato (*Solanum tuberosum*) tuber. Characterization, immunolocalization and effects of wounding. **Biochem. J.** 283: 813-21, 1992.
- MO, H., LIN, Z., SUN, C. A new lectin *Dolichos lablab*. Lectins Biology. **Biochemistry, Clinical Biochemistry**, v. 7: p. 35-40, 1990.
- MO, H., MEAH, Y., MOORE, J. G., GODSTEIN, I. J. Purification and characterization of *Dolichos lablab* lectins. **Glycobiology**, v. 9, p. 173-179, 1999.



- MOREIRA, R.A., PERRONE, J.C. Purification and parcial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 59, p. 783-789, 1977.
- MOREIRA, R. A. **Lectinas Vegetais: Uma Abordagem Química e Físico-Química**. Tese de Titular apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará. 600 p., 1998.
- MOTA, I. & WONG, D. . Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylatic activity of mouse ant-sera during the course immunization. **Life Science**, v. 8; p.813-820, 1969.
- MUHSIN, T.M., SALIH, T.H. Exocellular enzyme activity of dermatophytes and other fungi isolated from ruminants in Southern Iraq. **Mycopathologia**. v. 150, 2, 49-52, 2001.
- NENOFF, P. SUSS, K. FLEMMING, C. HAUSTEIN, U.F. . Differentiation of *Candida* strains by lectin-mediated agglutination kinetics. **Mycoses**, v.43 (3-4), p. 101-107, 2000.
- NIEVA MORENO, M. I., ISLA, M. I. SAMPIETRO, A. R., VANTTUONE, M. A. Biological activity of the lectins from mature *Cyphomandra batatea*. Sendt fruits. **Eur. J. Cell Biol.**, 74 (suppl 46), p. 35, 1997.
- NIMURA, K., NIWANO, Y., ISHIDUKA, S., FUKUMOTO, R. Comparison of in vitro antifungal activities of topical antimycotics launched in 1990s in Japan. **J. Antimicrobial Agents**, v. 18, 173-178, 2001.
- NI, Y., TIZARD, I. Lectin-carbohydrate interaction in the immune system. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 55, p. 205-223, 1996.
- NORRIS, H.A., ELEWSKI, B.E., GHANNOUM, M.A. Optimal growth conditions for the determination of the antifungal susceptibility of tree species of



- dermatophytes with the use of a microdilution method. **J. of the America Academy of Dermatology**, v. 40, 6:2, S9-13, jun., 1999.
- OSUME, M. The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. **Micron**, v. 29 (2/3), p. 207-233, 1998.
- PANÉS, J., PERRY, M. and GRANGER, N. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. **Br. J. Pharmacol.** v. 126, 537-550, 1999.
- PEACOCK, J.S., COLSKY, A.S. and PINTO, V.B. Lectins and antibodies as tools for studying cellular interactions. **J. Immunol.** v. 126, 147-157, 1990.
- PEREIRA, M.R.P. Resposta imunológica humoral em camundongos swiss alimentados com proteínas de sementes de *Lablab purpureus* (L.) Sweet (mangalô). **Monografia apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza-CE, 2000.
- PETERSEN, S.V., THIEL, S., JENSENIUS, J.C. The mannan-binding lectin pathway of complement activation: biology and disease association. **Molecular Immunology**, v. 38, p.133-149, 2001.
- PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E.J. M. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. **Trends Food Sci. Technol.** 7. 132-138, 1996.
- PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.** v. 109, 347-352, 1995.
- PEUMANS, W. J., WINTER, H., C, BEMER, V., VAN LEUVEN, F., GOLDSTEIN, I.J., TRUFFA-BACHI, P., VAN DAMME, E. J. M. Isolation of a novel plant lectin with an unusual specificity from *Calystegia sepium*. **Glycoconjugate J.**, 14, 259-265, 1997.

- PEUMANS, W.J. and VAN DAMME, E.J.M. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. In: **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, 199-228, 1998.
- PFALLER, M. A. Antifungal susceptibility testing: progress and future developments. **BJID**, v. 4, abril, 2000.
- PIER, A.C., HODGES, A.B., LAUZE, J.M. and RAISBECK, M. Experimental immunity to *Microsporium canis* and cross reactions with other dermatophytes of veterinary importance. **J. Medical & Veterinary Mycology**, v. 33, 93-97, 1995.
- POSTERARO, B., ROMANO, L., SANGUINETTI, M., MASUCCI, L., MORACE, G., FADDA, G. Commercial systems for fluconazole susceptibility testing of yeasts: comparison with the broth microdilution method. **Microbiology and Infectious Disease**, v. 38, 29-36, 2000.
- PODDA, A. Overview of the clinical use of MF59 adjuvant. **Vaccine**, v.21, p.3519, 2003.
- POTTS, S.J., THOMPSON, J.F. and SLAUGHTER, D.C. The effect of fungal species on the fluorescent lectin test. **Journal of Microbiological Methods**, v.46 (3), p. 187-191, 2001.
- PRATT, R. C., SINGH, N. K., SHADE, R. E., MURDOCK, L.L., BRESSAN, R.A., 1990. Isolation and partial characterization of a seed from tepary bean that delays bruchid beetle development. **Plant Physiol.** 93, 1453-1459, 1990.
- PROVOUST-DANON, A., WEYER, A., SILVA-LIMA, M., LAPEYRE, J., EXPERT-BEZANCON, N., DELPIERRE, A., DAVID, B.. Histamine release by *Dolichos lablab* lectin; **Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**, v.8, 1995.



- PUJOL, I., CAPILLA, J., FÉRNANDEZ-TORRES, B., ORTONEDA, M. and GUARRO, J. Use of the sensititre colorimetric microdilution panel for antifungal susceptibility testing of dermatophytes. **J. Clinical Microbiology**, July, p. 2618-2621, 2002.
- RABINOVICH, G.A., RUBSTEIN, N., TOSCANO, M.A. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. **Biochímica et Biophysica Acta**, v.1572, p. 274-284, 2002.
- RAMOS, M.V., BONFIM, R.L., CAVADA, B.S., ALENCAR, N.M.N., GRANGEIRO, T.B. and DEBRAY, Henry. Further characterization of the glucan-binding specificity of the seed lectin from *Vatairea macrocarpa* and its dependence of pH. **Proteins and peptides letters**, v. 7 (4) 241-248, 2000a.
- RAMOS, M.V., CAVADA, B.S., CALVETE, J.J., SAMPAIO, A.H., MAZARD, A.M., BARRE, A., THALLES, B.G., FREITAS, B.T., LEITE, B.H. and ROUGÉ, P. Specificity of the *Vatairea macrocarpa* lectin towards glycans exhibiting exposed Gal/GalNac residues. **Proteina and peptides letters**, v. 5 (3), 163-171, 1999.
- RAMOS, M.V., MOREIRA, R.A., CAVADA, B.S., OLIVEIRA, J.T.A. and ROUGÉ, P. Interaction of the lectins foram sub-tribe *Diocleinae* with specific ligands R. **Bras. Fisiol. Veg.**, v 8 (3), 193-199, 1996b.
- RAMOS, M.V., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, J.T.A., CAVADA, B.S., and ROUGÉ P. The carbohydrate-binding specificity and molecular modeling of *Canavalia marítima* and *Dioclea grandiflora* lectins. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 96 (6), 761-766, 1996a.
- RASHID, A. Arthroconidia as vectors of dermatophytosis. **Cutis; Cutaneous Medicine for the Practitioner**. v. 67, 5, 23, may 2001.
- RATANAPO, S., NGAMJUNYAPORN, W., CHULAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae pv mori*.



- REVEST, H. & BAETSELIER, P.. Lipoprotein I from *Pseudomonas. aeruginosa*: Th1 inducing natural adjuvant for protein antigens. **Vaccine**. 21, p. 3507-3508, 2003.
- RICO, H., CARILLO, C., AGUADO, C., MORMENEO, S. AND SENTANDREU, R. Initial steps of wall protoplast regeneration in *Candida albicans*. **Institut Pasteur/ Elsevier**, v. 148, p. 593-603, 1997.
- RIESELNAN, M.H., HAZEN, K. C., CUTLER, J.E. Determination of antifungal MICs by a rapid susceptibility assay. **J. Clinical Microbiology**, v. 38, 1, 333-340, Jan., 2000.
- RINI, J.M. and LOBSANOV, Y. D. New animal lectin structures. **Curr Opin in Structural biology**, v. 9, 578-584, 1999.
- ROMANI, L., BISTONI, F., PUCETTI, P. Initiation of helper cell immunity to *Candida albicans* by IL-12: the role neutrophils. **Chem. Immunol.** 68, p.110-135, 1997.
- ROBBINS, S.L., COTRAN, R. S., KUMAR, V. **Pathologic basis of diseases**. Philadelphia: W. B. Saunders,. 7<sup>a</sup> edition, Cap. 3: Inflammation and repair, 2004.
- ROBIN, J.B. ARFFA, R.C., AVNI, I. and RAO, N.A. Rapid visualization of three common fungi with fluorescein-conjugated lectins. **Invet. Ophthalmol. Vis. Sci.** v.27, p. 500-506, 1986.
- ROBIN, J.B. CHAN, R. and ANDERSON, B.R. Rapid visualization of *Acanthamoeba* using *fluorescein*-conjugated lectins. **Arch. Ophthalmol.** v.106, p. 1273-1276, 1988.

- ROBIN, J.B. NIELSON, S. and TROUSDALE, M.D. fluorescein-conjugated lectins identification of a case human keratomycosis. **Am. J. Ophthalmol.** v.102, p. 797-798, 1986.
- RÜDIGER, H. Plant lectins – more than just tools for glycoscientists: occurrence, structure and possible functions of plant lectins. **Acta Anat**, v. 161, 130-152, 1998.
- RUDD, M.R., WORMALD, M.R., DWEK, R.A. Sugar-mediated ligant-receptor interactions in the immune system. **TRENDS in biotechnology**, v. 22 (10), p. 524-536, 2004.
- RUIZ-HERRERA, J., SENTANDREU, R. and MARTINEZ, J.P. Chitin biosythesis in fungi. In. **Handbook of Applied Mycology**, v.. 4, Fungal Biotechnology, p. 281-312, 1992.
- SANTOS-DE-OLIVEIRA, R., DIAS-BARUFFI, M., THOMAZ, S.M.O., BELTRAMINI, L.M., Roque-Barreira, M.C. **J. Immunol.** 22, 1798-1807, 1994.
- SHARON, N., LIS, H.,. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, 246, 227-234., 1989
- SCHIJNS, V.E.J.C.V.. Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. **Current Opinion in Immunology.** 12, p. 456-463, 2000.
- SIDRIM, J.J.C. & ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos.** 2<sup>a</sup> ed. Guanabara Koogan.287p, 2004.
- SILVA-LIMA, M., PUSZTAI, A., NUNES, D.C.S. and FARIAS, M.E.L. Hemagglutinating activity of *Dolichos Lablab* seed protein. **J. Med. Biol Res.** v. 21, 219-222, 1988.

- SIMONETTI, N., SIMONETTI, G., STRIPPOLI V., CALLARI, A., and TECCA, M. Susceptibility assays of *Candida tropicalis* to miconazole. **J. Microbiological Methods**, v. 30, 221-229, 1997.
- SING, M. & O'HAGAN, D.T.. Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. **International Journal for Parasitology**. 33, p. 469-478, 2003.
- SINGH, R. S.; TIWARY, A K.; KENNEDY, J.F. Lectins: Sources, Activities, and Applications. **Critical Reviews in Biotechnology**. 19(2): 145-178, 1999.
- SOARES, R. M. A., SOARES, R. M. de A., ALVIANO, D.S., ANGLUSTER, J., ALVIANO, C.S., TRAVASSOS, L.R. Identification of sialic acids on the cell surface of *Candida albicans*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v.1474 (2), p. 262-268, 2000.
- SO, L.L., GOLDSTEIN, I.J. Protein-carbohydrate interaction. 9. Application of quantitative hapten inhibition technique to polysaccharide-concanavalin A interaction. Some comments on forces involved in concanavalin A-polysaccharide interaction. **J. Immunol.** 158-162, 1967.
- SALGARKAR, S., SOHONIE, K., Hemagglutinins of field bean (*Dolichos lablab*): Part I- Isolation, purification and properties of hemagglutinins. **Indian J. Biochem.**, 2: 193-196, 1965.
- SILVA, D.J. *Análise de Alimentos (Métodos Químicos e Biológicos)*. Viçosa. UFV, Imprensa Universitária, 165 p., 1990.
- SILVA, A.M. Efeito adjuvante de óleos vegetais comestíveis. **Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza-CE, 2004.
- SLIFKIN, M. and DOYLE, R.J. Lectins and their application to clinical microbiology. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 3 (3), p. 197-218, 1990.



- SPRINGER, T.A. Cell adhesion. Sticky sugars for selectins. **Nature**. v. 349, 197, 1991.
- SHARON, N. and LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Articles**. v. 13, 272-233, 1989.
- STARUCH, M.J. and WOOD, D.D. Reduction of serum interleukin-1 like activity after treatment with dexamethasone. **J. Leukoc Biol.**, v. 37, 193-207, 1985.
- STILLMARK, H. Über ricin ein giftiges ferment aus den samen von *Ricinus communis* L. und einige anderen Euphorbiaceae. **Inaugural Dissertation Dorpat, Tartu**, 1888.
- TEDDER, T.F., STEEBER, D.A., CHEIN, A. and ENGEL, P. The selectin: vascular adhesion molecules. **FASEB J.**, v. 9, 866-873, 1995.
- TKACS, J.S. and LAMPEN, J.O. Wall replication in *Saccharomyces* species: use of fluorescein-conjugated concanavalin A to reveal the site of mannan insertion. **J. Gen. Microbiol.** v. 72, p. 243-247, 1972.
- TRIPATHI, S. & MAITI, T.. Immunomodulatory role of native and heat denatured agglutinin from *Abrus precatorius*. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 37, p. 451-462, 2005.
- TSUBOI, R., OGAWA, H., BRAMONO, K., RICHARDSON, M.D., SHANKLAND, G.S., CROZIER, W.J., SEI, Y., NINOMIYA, J., NAKABAYASHI, A., TAKAIUCHI, I., PAYNE, C.D. and RAY, T.L. Pathogenesis of superficial mycoses. **J. Medical and Veterinary Mycology**, v. 32, 1, 91-104, 1994.
- TURNER, M.W.. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. **Immunology Today**. 17 (11), p. 532-540, 1996.

- UNDERHILL, D.M. & GANTNER, B.. Integration of toll-like receptor and signaling for tailored immunity. **Microbes and Infection**. 6, p. 1368-1373, 2004.
- URBINA, J.M., CORTÉS, J.C.G., PALMA, A., LÓPEZ, S.N., ZACCHINO, S.A., ENRIZ, R.D., RIBAS, J.C. and KOUZNETZOV, V.V. Inhibitors of the fungal cell wall. Synthesis of 4-aryl-4-N-arylamine-1-butenes and related compounds with inhibitory activities on B (1-3) Glucan and chitin synthases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 8. 691-698, 2000.
- 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.
- VAN DAMME, E. J. M., BRIKÉ, F., WINTER, H. C. VAN LEUVEN, F., GOLDSTEIN, I. J., and PEUMANS, W. J. Molecular cloning of two different manose-binding lectins from tulip bulbs. **Eur. J. Biochem**. 236, 419-427, 1996.
- VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W. J., BARRE, A., ROUGÉ, P., 1998. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles. **Plant Sci**. 17, 575-692, 1998.
- VAN DAMME, E. J. M., ALLEN, A. K. and PEUMANS, W. J., 1987. Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs. **FEBS Lett**. 215, 140-144, 1987.
- VAN DAMME, E.J.M., GOLDSTEIN, I.J., PEUMANS, W.J.. A comparative study of mannose-binding lectins from the Amaryllidaceae and Alliaceae. **Phytochemistry**, 30: 508-514, 1991



- VAN PARRIJS, J. BROEKAERT, W. E., GOLDSTEIN, J.I. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (Hevein brasiliensis) latex. **Planta**. V. 183, 258-262, 1991.
- VASCONCELOS, I.M., CAVADA, B.S., MOREIRA, R.A. and OLIVEIRA, J.T.A. Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea guianensis*. **Journal of food Biochemistry**. v. 15, 137-154, 1991.
- 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, p. 211-219, 2001.
- VIJAYAN, M. and CHANDRA, N. Lectins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, 707-714, 1999.
- WALZOG, B. & GAEHTGENS, P. Adhesion molecules: The path to a new understanding of acute inflammation. **News. Physiol. Sci.**, v. 15, 107-113, 2000.
- WANG, C., EUFEMI, M., TURANO, C., GIARTOSIO, A. Influence of carbohydrate moiety on the stability of glycoprotein. **Biochemistry** 35, 7299-7307, 1996.
- WATANABE, K., TANIGUCHI, H., KATOH, T. Adhesion of dermatophytes to healthy feet and its simple treatment. **Mycoses**, v. 43, 1-2, 45-50, 2000.
- WEIS, W.I., TAYLOR, M.E.; DRICKAMER, K. The C-type lectin superfamily in the immune system. **Immunol Rev**, v. 163, p. 19-34, 1998.
- WHALEY, K. and FERGUNSON, A. Molecule aspects of complement activation. **Mol. Aspects med.** v. 4, 209-273, 1981.



- WILLINGER, B., ENGELMANN, E., HOFMANN, H., METZGER, H., APFALTER, P., HIRSCHL, A.M., MAKRISTATHIS, A., ROTTER, M., RADDATZ, B. SEIBOLD, M. Multicenter comparison of fungitest for susceptibility testing of *Candida* species. **Diagnostic Microbiology and Infections Disease**, v. 44, 253-257, 2002.
- XU Q., LIU Y., WANG X., GU H., CHEN Z., Purification and characterization of a novel anti-fungal protein from *Gastrodia elata*, **Plant Physiol. Biochem.** 36, 899-905, 1998.
- YE, X.Y., WANG, H.X. and NG, T.B. Dolichin, a new chitinase-like antifungal protein isolated from field beans (*Dolichos lablab*). **Biochemical and Biophysical, Research Communications**, v. 269, 155-159, 2000.
- ZINKERNAGEL, R.M.. On natural and artificial vaccinations. **Annu. Ver. Immunol**, v.21, p. 515-546, 2003.
- ZURITA, J., HAY, R.J. Adherence of dermatophyte microconidia and arthroconidia to human keratinocytes in vitro. **J. Investigative Dermatology**. v. 80, 5, 529-534, November, 1987.