

RESPOSTA IMUNOLÓGICA A FRAÇÕES PROTÉICAS E LECTINA DE
Dioclea grandiflora Mart.

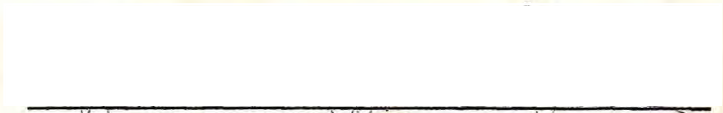
DIANA CÉLIA SOUSA NUNES

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA, COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - 1985


Esta Dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários a obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.


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


Diana Célia Sousa Nunes

DISSERTAÇÃO APROVADA EM

20/ix/85


Maria da Guia Silva Lima
Orientador da Dissertação


Renato de Azevedo Moreira


Iracema Lima Ainoz

*a meus pais
e a meus irmãos.*

Este trabalho foi realizado graças a auxílios das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de bolsa de Pós-Graduação concedida à autora e de auxílios ao curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através de auxílios ao curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, em cujos laboratórios esta dissertação foi preparada.

AGRADECIMENTOS

À professora MARIA DA GUIA SILVA LIMA pela inestimável orientação que me foi dada, por sua amizade, dedicação e constante incentivo durante a realização deste trabalho.

Agradeço aos professores RENATO DE AZEVEDO MOREIRA e IRACEMA LIMA AINOZ pelas valiosas sugestões apresentadas na elaboração desta dissertação.

Meus agradecimentos a Dra. ANNIE PROUVOST-DANON pelas sugestões apresentadas durante o desenvolvimento deste trabalho.

À professora ANA CECÍLIA HORTA BARROS pela ajuda na obtenção das frações proteicas, da semente em estudo, bem como, a LIA MAGALHÃES DE ALMEIDA pela colaboração.

Também agradeço aos demais professores, colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pelo ambiente de cooperação, estímulo e amizade.

Finalmente, agradeço aos meus pais e irmãos pelo carinho, compreensão, dedicação e apoio que sempre tiveram para comigo e com isso muito colaboraram para o bom desempenho deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	x
<u>LISTA DE TABELAS</u>	xiii
<u>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</u>	xiv
<u>RESUMO</u>	xv
<u>ABSTRACT</u>	xvii
1 - <u>INTRODUÇÃO</u>	1
1.1 - <u>Resposta Imunológica</u>	1
1.1.1 - Considerações Gerais	1
1.1.2 - Antígenos ou Alérgenos	1
1.1.3 - Anticorpos	2
1.1.4 - Anafilaxia - Alergia	2
1.1.5 - Classificação das Reações de Hipersensibilida de	4
1.1.6 - "Células-Alvo" na Reação Anafilática	4
1.1.7 - Manifestações da Anafilaxia	4
1.1.8 - Anticorpos Anafiláticos	5
1.1.9 - Vias de Imunização	7
1.1.10 - Imunização por Via Oral	9
1.2 - <u>Alérgenos Vegetais</u>	12
1.3 - <u>Lectinas</u>	15
1.3.1 - Definição e Propriedades	15
1.3.1.1 - Definição	15
1.3.1.2 - Propriedades	16
1.3.2 - Lectinas - Relação com a Imunologia	16
1.3.3 - Lectinas - Toxicidade Nutricional	18
1.4 - Objetivo	19

	Página
2 - <u>MATERIAIS</u>	21
2.1 - <u>Animais</u>	21
2.2 - <u>Antígenos</u>	21
2.3 - <u>Teste de Hemaglutinação</u>	23
2.4 - <u>Adjuvante</u>	23
2.5 - <u>Reagentes</u>	24
3 - <u>MÉTODOS</u>	25
3.1 - <u>Imunização por Via Subcutânea</u>	25
3.2 - <u>Imunização por Via Oral</u>	25
3.3 - <u>Obtenção de Antissoros</u>	25
3.4 - <u>Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA)</u>	26
3.4.1 - Reação de Anafilaxia Cutânea Passiva para IgE e IgG em Camundongos	26
3.4.2 - Reação de Anafilaxia Cutânea Passiva para IgE em Ratos	27
3.5 - <u>Esquema Experimental</u>	27
3.5.1 - Camundongos Imunizados por Via Subcutânea ...	27
3.5.2 - Camundongos Alimentados com 10 Doses do Antí- geno	28
3.5.3 - Camundongos Alimentados com Dose Única do An- tígeno e Posterior Imunização por Via Subcutâ- nea	30
4 - <u>RESULTADOS</u>	32
4.1 - <u>Resposta do Tipo IgG e IgE em Camundongos Imuni- zados por Via Subcutânea com 100 µg de Ovalbu- mina</u>	32
4.2 - <u>Resposta do Tipo IgG em Camundongos Imunizados por Via Subcutânea com Frações Protéicas de <i>Dioclea grandiflora</i> Mart.</u>	34
4.2.1 - Extrato total	34
4.2.2 - Lectina	36
4.2.3 - Extrato total sem lectina	38

4.3 - <u>Resposta do Tipo IgE em Camundongos Imunizados por Via Subcutânea com Frações Protéicas de <i>Dioclea grandiflora</i> Mart.</u>	40
4.3.1 - Extrato total	40
4.3.2 - Lectina	43
4.3.3 - Extrato total sem lectina	45
4.4 - <u>Resposta do Tipo IgG em Camundongos Alimentados com 10 Doses de Frações Protéicas de <i>Dioclea grandiflora</i> Mart.</u>	48
4.4.1 - Extrato total	48
4.4.1.1 - Extrato total 100 µg	48
4.4.1.2 - Extrato total 1000 µg	50
4.4.2 - Lectina	50
4.4.2.1 - Lectina 1 µg	50
4.4.2.2 - Lectina 10 µg	51
4.4.2.3 - Lectina 100 µg	51
4.4.2.4 - Lectina 1000 µg	53
4.4.3 - Extrato total sem lectina	53
4.4.3.1 - Extrato total sem lectina 100 µg	53
4.4.3.2 - Extrato total sem lectina 1000 µg	54
4.5 - <u>Resposta do Tipo IgE em Camundongos Alimentados com 10 Doses de Frações Protéicas de <i>Dioclea grandiflora</i> Mart.</u>	54
4.5.1 - Extrato total	54
4.5.1.1 - Extrato total 100 µg	54
4.5.1.2 - Extrato total 1000 µg	54
4.5.2 - Lectina	56
4.5.2.1 - Lectina 1 µg	56
4.5.2.2 - Lectina 10 µg	56
4.5.2.3 - Lectina 100 µg	58
4.5.2.4 - Lectina 1000 µg	58
4.5.3 - Extrato total sem lectina	58
4.5.3.1 - Extrato total sem lectina 100 µg	58

	Página
4.5.3.2 - Extrato total sem lectina 1000 µg	59
4.6 - <u>Resposta do Tipo IgG em Camundongos Alimentados com Dose Única de Frações Protéicas com Posterior Imunização por Via Subcutânea com os Mesmos Antígenos, Extraídos de <i>Dioclea grandiflora</i> Mart.</u>	59
4.6.1 - Extrato total	59
4.6.2 - Lectina	61
4.6.3 - Extrato total sem lectina	61
4.7 - <u>Resposta do Tipo IgE em Camundongos Alimentados com Dose Única de Frações Protéicas com Posterior Imunização por Via Subcutânea com os Mesmos Antígenos, Extraídos de <i>Dioclea grandiflora</i> Mart.</u>	64
4.7.1 - Extrato total	64
4.7.2 - Lectina	65
4.7.3 - Extrato total sem lectina	65
5 - <u>DISCUSSÃO</u>	67
6 - <u>CONCLUSÕES</u>	73
7 - <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	75
8 - <u>COMUNICAÇÕES A CONGRESSOS</u>	86

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
1 - Representação da resposta imunológica	3
2 - Esquema de fixação da IgE aos mastócitos (1) e formação de pontes com o antígeno ou alérgeno (2)	6
3 - Representação esquemática dos mecanismos envolvidos na resposta imunológica a antígenos da dieta	13
4 - Esquema de obtenção do extrato total sem lectina	22
5 - Resposta do tipo IgG e IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 100 µg de Ovalbumina	33
6 - Resposta do tipo IgG em camundongos imunizados por via subcutânea com extrato total (<i>Dioclea grandiflora</i> Mart.)	35
7 - Resposta do tipo IgG em camundongos imunizados por via subcutânea com lectina (<i>Dioclea grandiflora</i> Mart.)	37
8 - Resposta do tipo IgG em camundongos imunizados por via subcutânea com extrato total sem lectina (<i>Dioclea grandiflora</i> Mart.)	39
9 - Resposta do tipo IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com extrato total (<i>Dioclea grandiflora</i> Mart.)	42
10 - Resposta do tipo IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com lectina (<i>Dioclea grandiflora</i> Mart.)	44

FIGURA	Página
11 - Resposta do tipo IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com extrato total sem lectina (<i>Dioclea grandiflora</i> Mart.)	46
12 - Resposta do tipo IgG em camundongos alimentados com 10 doses de extrato total (<i>Dioclea grandiflora</i> Mart.)	49
13 - Resposta do tipo IgG em camundongos alimentados com 10 doses de lectina (<i>Dioclea grandiflora</i> Mart.)	52
14 - Resposta do tipo IgE em camundongos alimentados com 10 doses de extrato total (<i>Dioclea grandiflora</i> Mart.)	55
15 - Resposta do tipo IgE em camundongos alimentados com 10 doses de lectina (<i>Dioclea grandiflora</i> Mart.)	57
16 - Resposta do tipo IgG em camundongos alimentados com dose única de 1,0 mg de extrato total com posterior imunização por via subcutânea com 100 µg de extrato total (<i>Dioclea grandiflora</i> Mart.)	60
17 - Resposta do tipo IgG em camundongos alimentados com dose única de 1,0 mg de lectina com posterior imunização por via subcutânea com 100 µg de lectina (<i>Dioclea grandiflora</i> Mart.).	62
18 - Resposta do tipo IgG em camundongos alimentados com dose única de 1,0 mg de extrato total sem lectina com posterior imunização por via subcutânea com 100 µg de extrato total sem lectina (<i>Dioclea grandiflora</i> Mart.)	63
19 - Resposta do tipo IgE em camundongos alimentados com dose única de 1,0 mg de extrato to-	

FIGURA

Página

tal sem lectina com posterior imunização por via subcutânea com 100 µg de extrato total sem lectina (<i>Dioclea grandiflora</i> Mart.)	66
---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA

Página

1 - Propriedades dos anticorpos anafiláticos de camundongos	8
--	---

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

Con A	Concanavalina A
E.T.	Extrato total de <i>Dioclea grandiflora</i> Mart.
E.T.-PIII	Extrato total sem lectina de <i>Dioclea gran</i> <i>diflora</i> Mart.
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
OVA	Ovalbumina
PCA	Anafilaxia cutânea passiva
PHA	Lectina de <i>Phaseolys vulgaris</i>
PIII	Lectina de <i>Dioclea grandiflora</i> Mart.
U.H.	Unidade de hemaglutinação, definida como o inverso da maior diluição de uma solução que ainda é capaz de aglutinar uma suspensão de hemácias a 2% em NaCl 0,15 M <u>com Ca⁺² 5mM e</u> <u>Mn⁺² 5mM.</u>

RESUMO

A resposta imunológica foi estudada em camundongos imunizados por via subcutânea e oral, com frações proteicas solúveis de *Dioclea grandiflora* Mart., em diferentes concentrações, determinando-se os níveis séricos de IgG e IgE específicas por PCA.

A síntese de IgG induzida por imunização subcutânea com doses crescentes de antígenos (E.T., PIII e E.T.-PIII), mostrou que os títulos de PCA aumentavam com a dose de antígeno sensibilizante, embora fossem mais baixos quando PIII (lectina) era o antígeno. A resposta específica do tipo IgG anti-E.T.-PIII apareceu mais cedo do que a resposta anti-E.T. e anti-PIII, onde a lectina estava presente. Nas mesmas condições de imunização, a síntese de IgE específica apresentou-se mais intensa, com doses mais baixas de PIII, mas aumentou paralelamente com as doses sensibilizantes de E.T. e E.T.-PIII. Contrariamente à resposta do tipo IgG, a resposta do tipo IgE foi antecipada em presença de PIII.

A síntese de IgG induzida por E.T. e PIII através de sensibilização por via oral revelou-se pelos títulos de PCA, ainda em primária, contra o antígeno contendo lectina. Estes títulos de PCA aumentavam com a dose do agente sensibilizante. Títulos de IgG anti-PIII revelaram-se mais baixos após reforço. Não foram detectadas nem IgG nem IgE específicas com E.T.-PIII usado como antígeno. Títulos de IgE anti-E.T. foram revelados na resposta primária, mas não foram potenciados após reforço. Somente um esquema de 10 doses de 10 µg de PIII por via oral foi capaz de induzir síntese de IgE específica.

Alimentação prévia com dose única de E.T. e de PIII não induziu síntese nem de IgG nem de IgE específicas. Contudo, esta alimentação prévia contendo lectina, antecipa a síntese de IgG específica e suprime a de IgE específica, induzidas após imunização subcutânea, com as mesmas frações. Após alimentação prévia com dose única de E.T.-PIII não foi revelada a síntese de IgG e os títulos de PCA para IgE específica foram semelhantes aos revelados sem alimentação prévia.

A resposta imunológica induzida pelos antígenos de *Dioclea grandiflora* Mart. variou com a via de imunização e foi influenciada pela lectina que parece modular a síntese de IgG e IgE.

SUMMARY

The immunological response was studied in mice subcutaneously and orally immunized with different concentrations of soluble protein fractions of *Dioclea grandiflora* Mart. by determining the serum levels of specific IgG and IgE through PCA.

The IgG synthesis induced by subcutaneous immunization with increasing doses of antigen (E.T., PIII and E.T.-PIII) showed that the titers of PCA increased according to the sensitizing dose of antigen, although they were lower when PIII (lectin) was the antigen. The IgG specific answer anti-E.T.-PIII was disclosed earlier than the answer anti-PIII and E.T., where the lectin was present. With the same immunizing conditions, the specific synthesis of IgE was higher with lower sensitizing doses of PIII but such synthesis ran paralelly with the sensitizing doses of E.T. and E.T.-PIII. Differently to IgG, IgE response was anticipated when PIII (lectin) was present.

The IgG synthesis induced by oral immunization with E.T. and PIII was revealed by PCA titers, in the primary response, against the antigen containing lectin. This PCA titers increased with the dose of the sensitizing antigen. The IgG titers anti-PIII were shown to be lower after booster. It was not detected neither specific IgG nor specific IgE when E.T.-PIII was orally used as antigen. IgE titers anti-E.T. were revealed in primary response, but they were not potentially after booster. Only the scheme of 10 oral doses of 10 µg of PIII was able to induce IgE specific synthesis.

A previous oral feeding with a single dose of E.T.

and PIII did not induce specific synthesis of IgG neither IgE. However, such previous feeding containing lectin anticipates the IgG specific synthesis induced after subcutaneous immunization with the same fractions. After a previous feeding with a single dose of E.T.-PIII it was not revealed any synthesis of specific IgG and the PCA titers for specific IgE were shown to be similar to the ones revealed without previous feeding.

The immunological response induced by the antigens of *Dioclea grandiflora* Mart. varied according to the route of immunization and the lectin exerted an influence on it, apparently modulating the synthesis of IgG and IgE.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Resposta Imunológica

1.1.1 - Considerações Gerais

A resposta imunológica é um processo de acomodação variável, que leva os animais a produzirem anticorpos e células reativas, em resposta a uma grande variedade de moléculas e de macromoléculas orgânicas, especialmente proteínas. A resposta imunológica é encontrada somente em vertebrados, onde é de muita importância para a sobrevivência, constituindo o principal meio de defesa, não somente contra agentes infecciosos, como também outros agentes (por exemplo: aloenxertos, hemácias, pólenes, drogas) e mesmo a constituintes do próprio organismo ("self") nos processos de auto-imunidade. Originalmente, o interesse no papel da imunidade era devido principalmente a seu desempenho contra infecções, mas há muito tornou-se evidente que a resposta imunológica pode ser induzida contra uma imensa variedade de substâncias, relacionando-se com processos biológicos os mais variados.

1.1.2 - Antígenos ou Alérgenos

São compostos de alto peso molecular, identificados na maior parte das vezes como a porção protéica do composto, capazes de induzir uma resposta imunológica e de reagir especificamente com o produto desta resposta. A respos-

ta imunológica pode ser mediada por células - imunidade celular - em que o antígeno interage especificamente com linfócitos reativos e também através de moléculas de anticorpos - imunidade humoral - amplamente difusíveis na circulação sanguínea e em outros fluídos do organismo (FIGURA 1).

1.1.3 - Anticorpos

São imunoglobulinas que se formam em resposta ao estímulo imunogênico e têm a capacidade de reagir especificamente com determinantes antigênicos do composto que induziu à imunização. Os anticorpos constituem cinco classes de imunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE.

1.1.4 - Anafilaxia - Alergia

Anafilaxia foi o primeiro fenômeno de hipersensibilidade descoberto e identificado. RICHET & HÉRICOURT (1898) verificaram que, inoculando-se em cães doses repetidas de soro de enguia, os animais, ao invés de adquirirem imunidade, tornavam-se hipersensíveis àquela substância. Estudos posteriores levaram RICHET & PORTIER (1902) a mostrar que a resposta imunológica pode ser altamente perigosa. Tal conclusão foi obtida quando eles estudavam a toxicidade de extratos de anêmonas do mar, injetados em cães os quais recebiam uma segunda injeção, 21 dias após a primeira; os animais apresentavam alterações biológicas variadas e morriam. Ao invés de aumento de resistência, um estado oposto era criado, e esta resposta foi chamada de anafilaxia (do grego, ana - contra; phylaxis - proteção), que significa um aumento da suscetibilidade a uma substância tóxica. Em 1906, von PIRQUET por sua vez, introduziu o termo Alergia (do gre

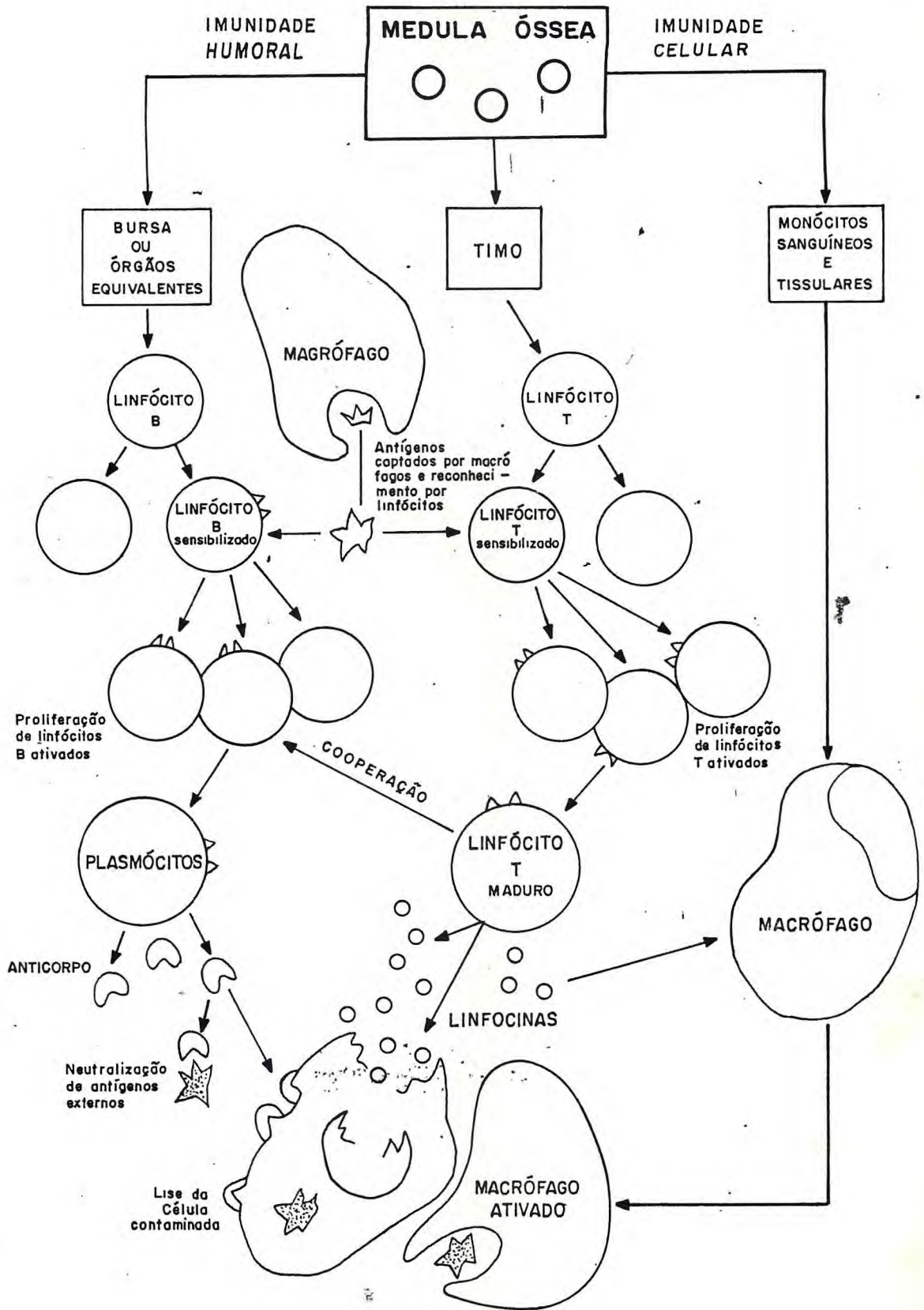


FIGURA 1 - Representação da resposta imunológica.

go, "ação alterada") para designar qualquer resposta a uma substância, induzida por uma exposição prévia à mesma.

1.1.5 - Classificação das Reações de Hipersensibilidade

GELL & COOMBS (1968) propuseram uma classificação para as reações de hipersensibilidade. Foram estabelecidos 4 (quatro) grupos principais, baseados nos mecanismos iniciadores, pelos quais um animal ou indivíduo sensibilizado por um antígeno ou alérgeno pode reagir e apresentar sintomas de hipersensibilidade clínica. Os tipos I, II e III são mediados por anticorpos e são chamadas reações de hipersensibilidade imediata. O tipo IV é mediado por linfócitos ativados ou sensibilizados que envolvem a liberação de linfocinas e é chamada reação de hipersensibilidade retardada ou hipersensibilidade celular.

1.1.6 - "Células-Alvo" na Reação Anafilática

Os mastócitos e os basófilos são as "células-alvo" da reação anafilática. Os mastócitos são células que se distinguem pelo seu alto conteúdo em histamina, que está concentrada em grânulos citoplasmáticos e é secretada durante o desencadeamento da anafilaxia. São encontradas em associação com capilares no tecido conjuntivo, por todo o organismo. Os basófilos representam cerca de 1% (um por cento) dos leucócitos do sangue e assemelham-se aos mastócitos quanto ao aspecto e ao conteúdo e secreção de histamina.

1.1.7 - Manifestações da Anafilaxia

As manifestações da anafilaxia são provocadas pela liberação de substâncias vasoativas das células dos tecidos em resposta à formação dos complexos antígeno-anticorpo (FIGURA 2). Estas substâncias, histamina e serotonina, preexistem nas células e são liberadas quando da formação dos complexos, produzindo uma vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. A anafilaxia pode levar a uma resposta sistêmica através de choque, ingurgitamento vascular, asfixia e até a morte, podendo também ocorrer uma resposta restrita no local da injeção - anafilaxia cutânea - caracterizada por eritema e edema. Os fenômenos da anafilaxia sistêmica e localizada ocorrem não somente em organismos ativamente sensibilizados, como também nos passivamente sensibilizados. A anafilaxia ativa requer um período de sensibilização de uma a duas semanas, tempo necessário à formação de anticorpos, enquanto que a passiva requer um período de latência que se limita a algumas horas e que corresponde ao tempo necessário para a difusão dos anticorpos, no interior dos tecidos, e à sua fixação aos mesmos. Os mecanismos básicos da anafilaxia têm sido estudados através da anafilaxia cutânea passiva (PCA), que pode ser provocada de uma forma simples e segura em locais num mesmo animal e é visualizada através do uso de um corante, no caso o azul de Evans, associado ao antígeno, que penetra no espaço perivascular, formando assim uma mancha visível na pele, no local da inoculação. Esta técnica foi desenvolvida por OVARY (1952), e é ainda amplamente empregada.

1.1.8 - Anticorpos Anafiláticos

As imunoglobulinas da classe IgE e uma subclasse de IgG (IgG₁) são responsáveis pelo desencadeamento das manifestações anafiláticas na maioria dos mamíferos (PROUVOST-

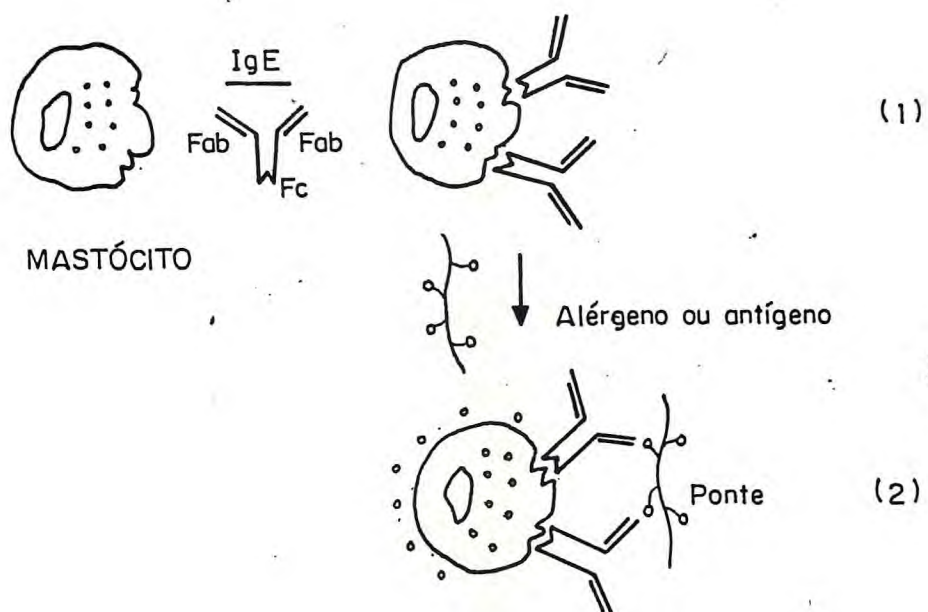


FIGURA 2 - Esquema de fixação da IgE aos mastócitos (1) e formação de pontes com o antígeno ou alérgeno(2).

-DANON et al., 1972). Estes anticorpos possuem diferentes propriedades de fixação nas chamadas "células-alvo" ("target cells") da reação anafilática, mastócitos e basófilos. Enquanto a fixação de IgE a receptores celulares é inquestionável, o mesmo não ocorre com a fixação da porção Fc da IgG. Entretanto, em camundongos foi evidenciado que IgG em forma de complexo é fixada aos mastócitos através de receptores distintos dos que fixam IgE (DAËRON et al., 1980). Estes anticorpos anafiláticos têm sido largamente estudados (PROUVOST-DANON et al., 1975, BINAGHI & PERRUDET-BADOUX, 1977 e LEHRER, 1977), e são chamados anticorpos homocitotrópicos, embora a IgE de camundongos fixe-se a mastócitos de ratos. Não obstante, IgE e IgG serem ativas na anafilaxia cutânea passiva, elas apresentam características distintas (TABELA 1).

A síntese de anticorpos anafiláticos é modulada por vários fatores, entre os quais o patrimônio genético do animal a ser imunizado e a dose do agente sensibilizante. Assim é que, na base da seleção genética, já foi demonstrada a existência de linhagens de camundongos "bons respondedores" e "maus respondedores" no tocante ao nível de produção de anticorpos (BIOZZI et al., 1977). Por outro lado, altas doses do antígeno induzem uma resposta do tipo IgE baixa e transitória, mas a resposta do tipo IgG é considerada ótima. É sabido que doses baixas do antígeno induzem uma resposta do tipo IgE alta e duradoura.

1.1.9 - Vias de Imunização

A resposta imunológica de um organismo depende da dose do agente sensibilizante, da natureza antigênica da substância, bem como da sua via de introdução.

A via subcutânea é uma via bastante utilizada expe-

TABELA 1 - Propriedades dos anticorpos anafiláticos de camundongos (PROUVOST - DANON, 1972).

Propriedades	Tipo de anticorpos	
	IgG	IgE
Produção no soro após imunização	++++	+
Termolabilidade	-	+ (56°C)
Sensibilidade ao mercaptoetanol	<u>+</u>	+
Peso molecular	155.000	200.000
Mobilidade eletroforética	$\gamma 1$	γ rápida
Passagem através das membranas biológicas	+	-
Período de latência para PCA	curta	longa
Persistência no local da sensibilização	menos de 1 dia	10 dias ou mais
Dose detectada por PCA	$2 \cdot 10^{-3}$ ug	10^{-4} ug ?
Período de sensibilização em mastócitos	ausente	obrigatório
Fixação sobre mastócitos	-	+
Persistência sobre mastócitos	-	6 dias ou mais
Formação de complexo Antígeno-Anticorpo	+	?
Fixação de complemento	-	-
Intervenção no metabolismo celular	+	+

rimentalmente para a obtenção de anticorpos circulantes, uma vez que o antígeno administrado não sofre a interferência dos processos do trato digestivo. É, portanto, uma via artificial.

A via nasal vem sendo mais e mais utilizada, sobretudo para a compreensão dos fenômenos ligados a asma, rinites alérgicas e outras reações alérgicas do trato respiratório. Para tanto, antígenos são administrados por via nasal, a qual representa uma porta de entrada natural (HOLT et al., 1981).

Uma via que vem sendo bastante explorada para os estudos das alergias alimentares é a via oral. Nela o antígeno ministrado ao animal sofre um processo digestivo natural ao cabo do qual poderá escapar à degradação proteolítica no intestino, agir modificando e interferindo nas funções digestivas e induzindo sensibilização.

1.1.10 - Imunização por Via Oral

Já em 1891, EHRLICH mostrou que a estimulação antigênica local da mucosa gastrointestinal levava ao aumento de anticorpos circulantes em camundongos, alimentados com pequenas quantidades de ricina. Estes animais desenvolviam um fator específico no soro que os protegia dos efeitos tóxicos de uma grande dose oral de proteína, enquanto animais não expostos, mas que estavam amamentando, ingerindo ricina, eram igualmente protegidos. Mais tarde, WELLS & OSBORNE (1911) relataram que cobaias, alimentadas com dietas contendo milho, desenvolviam uma tolerância imunológica à zeína. Este estado de tolerância foi estudado não somente em relação a proteínas vegetais, mas também a substâncias de origem variada. Assim é que, CHASE (1946) demonstrou um estado de tolerância induzido em cobaias por prévia alimentação

com o hapteno 1 cloro-2,4, dinitrobenzeno. Mais recentemente, um número maior de publicações tem aparecido sobre este assunto. DAVID (1975) observou a inibição da formação de anticorpos IgE em ratos alimentados com soro de cavalo ou extratos de pólen, enquanto THOMAS & PARROTT (1974) induziram tolerância em ratos à albumina bovina por prolongada alimentação; igual efeito foi causado quando ANDRÉ et al. (1975) induziram um profundo e prolongado estado de tolerância imunológica específica através da exposição a doses moderadas do antígeno por via digestiva. Resultado semelhante foi obtido por HANSON et al. (1977), usando uma proteína imunogênica. THOMAS & PARROT (1974) demonstraram que a tolerância induzida pela administração oral de antígenos proteicos solúveis era semelhante à tolerância induzida por via parenteral. Na tentativa de reverter a tolerância induzida, HANSON et al. (1979) utilizaram a transferência adotiva de células do baço de animais normais e concluíram que a resposta imunológica era irreversível em camundongos tolerantes, o que os levou a sugerir que a tolerância era causada por um mecanismo supressor ativo. Para explicar o fenômeno da tolerância induzida, após alimentação com o antígeno, pesquisas anteriores sugeriam a existência de mecanismos que envolviam a formação de células T supressoras pelas placas de Peyer e pelo baço. Deste modo, NGAN & KING (1978) mostraram que uma simples dose oral de ovalbumina (OVA) resultava na inibição de IgE em camundongos. Os mesmos autores também observaram que repetidas alimentações induziam a formação de células supressoras detectáveis nas placas de Peyer e baço. Essa supressão era demonstrada pela capacidade da transferência adotiva de linfócitos das placas de Peyer e do baço dos animais tolerantes, de inibir a formação de IgE em camundongos imunizados. A supressão era específica, e os linfócitos das placas de Peyer mostraram-se supressores mais efetivos do que os do baço.

Uma grande variedade de anticorpos (locais e sistêmicos) e resposta imunológica celular a antígenos de origem variada, introduzidos por administração oral, foram demonstrados em diferentes condições. A administração de antígenos protéicos por via oral, causando a produção e secreção local de IgA, foi demonstrada por CRABBÉ et al. (1969), SEWELL et al. (1979). Não só a produção de imunoglobulinas, como a supressão específica da resposta sistêmica do tipo IgG e do tipo IgE foi demonstrada (STRANNEGARD & YURCHISION, 1969, ROTHBERG et al., 1973, HIGAN & KIND, 1978, RICHMAN et al., 1978, HANSON et al., 1979 e RICHMAN, 1979).

RICHMAN et al. (1981) examinaram a resposta imunológica a IgA e IgG, envolvendo as placas de Peyer e os linfonodos periféricos. Os autores notaram que com 24 horas após a administração oral de ovalbumina (OVA), apareciam nas placas de PEYER células T "helper" específicas para IgA, e simultânea ou imediatamente após a indução de células T "helper" específica para IgA, surgiam as células T supressoras específicas para IgG. Desse modo, as células T das classes específicas nos tecidos linfóides, associados ao intestino, regulam a resposta imunológica causada pelo encontro com o antígeno da dieta, com isso, justificando a ocorrência de imunidade da mucosa e tolerância sistêmica.

A imunização oral foi também estudada como uma medida preventiva contra infecções entéricas em cobaias (PORTER et al., 1974), bem como na investigação de uma possível interferência na absorção intestinal (ANDRÉ et al., 1974).

Inicialmente, a imunização oral e, posteriormente a nasal foram usadas na proteção contra patógenos, graças aos estudos de BESREDKA (1927) que sugeriu a existência de um sistema imune nas mucosas. Este sistema fortalecia a barreira epitelial dos tratos respiratório, reprodutor e digestivo contra a penetração de microorganismos, macromoléculas e outras partículas estranhas aos tecidos e à circulação sistêmica. A estrutura da mucosa é pois constituída de nódulos

los linfóides agregados e isolados da mucosa, associados a células individuais: linfócitos, macrófagos, bem como mastócitos (BARRATT et al., 1979) (FIGURA 3).

Embora a mucosa represente uma barreira contra a penetração de substâncias, é sabido que material antígenicamente intacto é absorvido em quantidades suficientes para induzir modificações na resposta imune do organismo (VAZ et al., 1977).

Baseados em dados de permeabilidade, BYARS & FERRARESI (1976) estabeleceram um modelo de alergia alimentar e demonstraram que a permeabilidade do tecido era alterada quando ratos eram sensibilizados por via parenteral com ovalbumina (OVA) para induzir a formação de IgE, com subsequente desencadeamento por via oral, mas que retornava rapidamente ao estado normal, quando comparada ao controle.

1.2 - Alérgenos Vegetais

Praticamente qualquer alimento pode causar reações alérgicas. Entre os alimentos de origem vegetal, os grãos de cereais e de leguminosas são considerados como os que com maior frequência induzem reações alérgicas. Algumas tentativas foram feitas para determinar o denominador comum, por assim dizer, da alergenicidade, entre os alimentos diversos de origem vegetal botanicamente interrelacionados. São comuns as medidas preventivas (PINESS et al., 1940) de reações alérgicas evitando-se alimentos de origem botânica próxima, embora se saiba como elas são discutíveis. Alimentos de uma mesma origem botânica podem possuir alérgenos comuns, mas em quantidades diferentes nos diversos membros da família, levando, pois, a diferentes situações de reatividade de imunológica.

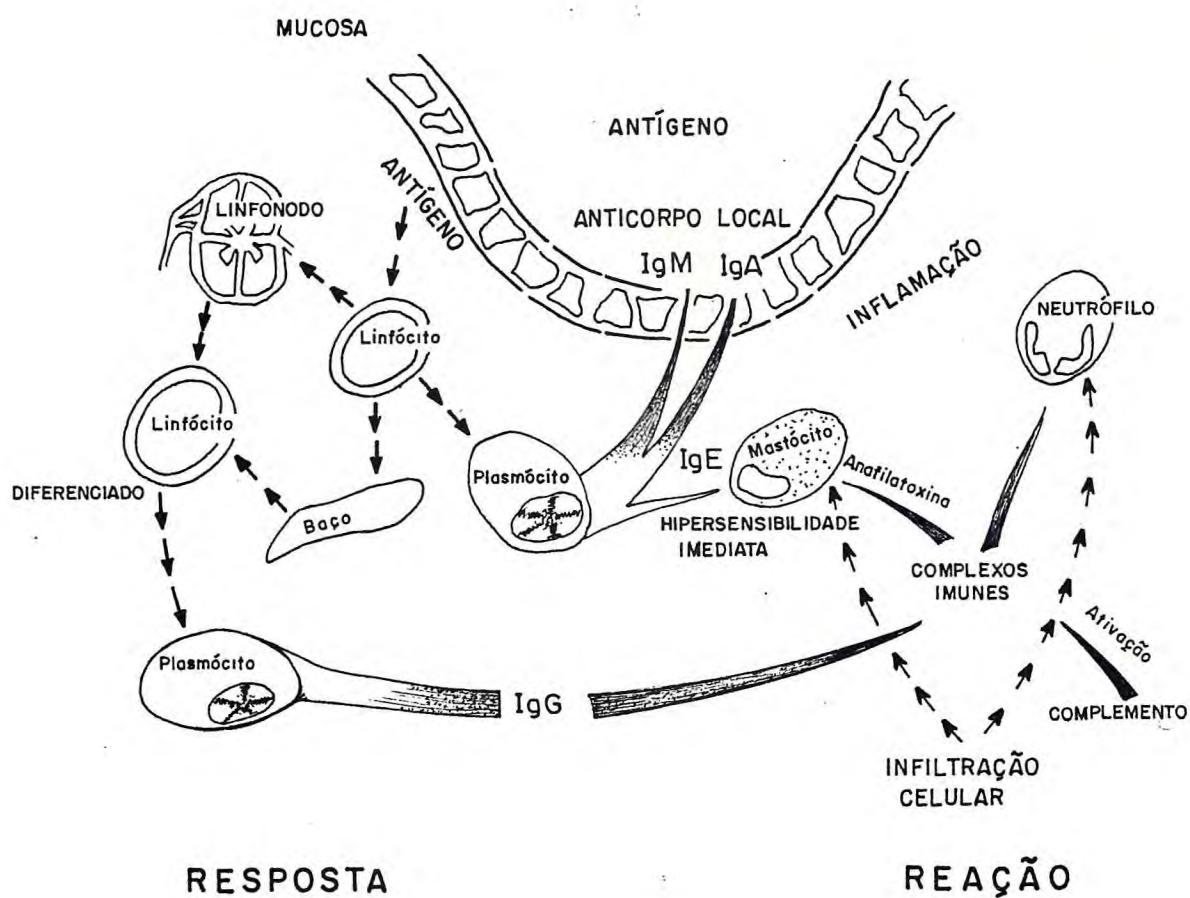


FIGURA 3 - Representação esquemática dos mecanismos envolvidos na resposta imunológica a antígenos da dieta (BARRATT et al., 1979).

Dentre as plantas há enorme variação de seus alérgenos quando se toma em consideração os diferentes órgãos de uma mesma planta. Para por em evidência a complexidade do assunto, pode-se ver que as folhas de uma planta, por exemplo, podem não conter alérgenos mas o pólen e as sementes podem, em quantidades mínimas, produzir intensas reações alérgicas (LAYTON et al., 1962). Sobre a natureza química dos alérgenos vegetais, pode-se dizer que são substâncias de alto peso molecular, não dialisáveis e na maioria dos casos identificados como proteínas (ENGELFRIED, 1940). No caso do trigo, a fração albumínica é dada como possível responsável pela alergenicidade deste cereal (PERLMAN, 1980). Também nas sementes de mamona e algodão (YOULE & HUANG, 1978 e 1979), onde a maioria dos estudos sobre natureza química dos alérgenos foram feitos, foi mostrado que as proteínas 2S, solúveis em água e por isso consideradas como fazendo parte da fração albumínica, eram alérgenos potentes (SPIES et al., 1951). Estas proteínas do tipo 2S foram também estudadas em várias outras sementes de oleaginosas, como avelã, nozes, noz moscada, etc (YOULE & HUANG, 1981).

A peculiaridade dos alérgenos está no fato de que não podem ser considerados como toxinas verdadeiras ou fatores anti-nutricionais em si mesmo, uma vez que elas só afetam indivíduos predispostos a isto, ou melhor sensíveis a estas proteínas. Esta sensibilidade ou prediposição é uma característica genética do indivíduo e não decorre do alérgeno que para alguns pode ser uma proteína de alto valor nutricional.

As proteínas 2S por seu teor em cisteína e metionina podem merecer especial atenção em caso de utilização na alimentação animal e humana. Mas, como já foi previamente mostrado, em mamona e sementes de algodão, que tais proteínas são alérgenos potentes, a sua utilização na alimentação deve ser feita de modo controlado. Por seu caráter tóxico, poder-se-ia especular que, os alérgenos, os inibidores de

tripsina e as lectinas fariam frente ao arsenal de defesa que a planta lançou mão no correr de sua evolução para se precaver de "predadores", entre os quais estaria o próprio homem.

O estudo pois dos alérgenos de origem vegetal, além de poder ser encarado do ponto de vista da nutrição animal, deverá ser considerado ainda como relevante do ponto de vista do bom desempenho do vegetal.

1.3 - Lectinas

1.3.1 - Definição e Propriedades

1.3.1.1 - Definição

Em 1980, GOLDSTEIN et al. propuseram a seguinte definição para lectinas, adotada pelo "Nomenclature Committee of IUB" e pela "Joint Commission on Biochemical Nomenclature" (1981): lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune, que fixam açúcar e aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados. Esta definição foi contestada porque excluía proteínas que ligam carboidratos e que são estruturalmente relacionadas com as lectinas de uma mesma planta, mas não aglutinam células (KOCOUREK & HOREJSI, 1981). Embora reconhecendo este fato, o Comitê de Nomenclatura persistiu com a definição anterior por causa da ênfase dada à exclusão das outras proteínas que ligam carboidratos (DIXON, 1981). Diante disto, KOCOUREK & HOREJSI (1983) formularam uma nova definição: lectinas são proteínas de natureza não imunoglobulínica capazes de reconhecimento específico e de ligação reversível a porções glicídicas de carboidratos complexos sem alterar a estrutura covalente de quaisquer li-

gantes glicosídicos reconhecidos. A adequação desta definição foi reforçada pelos resultados dos estudos genéticos e estruturais de algumas proteínas que ligam carboidratos e das lectinas numa mesma planta, mostrando que tais proteínas são, na realidade, lectinas monovalentes (ETZLER, 1985). A nova definição foi utilizada por ETZLER (1985), em recente trabalho de revisão.

1.3.1.2 - Propriedades

As lectinas caracterizam-se por apresentar diversas propriedades. Elas podem:

- aglutinar outros tipos de células: células tumorais e células embrionárias (SHARON et al., 1974), propriedade aplicada no estudo do câncer;

- possuir atividade mitogênica: estimulam os linfócitos (SHARON et al., 1974);

- ser tóxica a animais (JAFFÉ, 1969, PUSZTAI et al., 1979 e PUSZTAI et al., 1981);

- induzir liberação de histamina em mastócitos e basófilos (HOOK et al., 1974, SIRAGANIAN & SIRAGANIAN, 1974 e TRUNEH & PEARCE, 1981);

- degranular mastócitos (SILVA-LIMA et al., 1980, e SILVA-LIMA et al., 1981).

1.3.2 - Lectinas - Relação com a Imunologia

As lectinas têm despertado interesse aos imunologistas pelo fato de aglutinarem eritrócitos do mesmo modo que os anticorpos aglutinam antígenos, bem como pela capacidade de interagir com linfócitos e induzir a transformação blás-

tica (SHARON et al., 1974). A maneira que as lectinas interagem com açúcares para formar precipitados é semelhante à reação de precipitina entre antígeno e anticorpo, uma vez que ambos exigem especificidade e que podem ser inibidas por açúcares.

As mudanças morfológicas e os eventos bioquímicos de linfócitos estimulados por lectina "in vitro" são semelhantes aos de uma reação imunológica induzida por antígeno "in vivo". Do mesmo modo, a indução de células blásticas pelas lectinas leva à síntese de imunoglobulinas de modo semelhante às células estimuladas por antígeno "in vitro" (SHARON et al., 1977). As lectinas estimulam uma grande variedade de células, independente da especificidade dos receptores de linfócitos. Portanto, foram colocadas na classe de ativadores policlonais (SHARON & LIS, 1977).

O mecanismo de ação mitogênica das lectinas sobre os linfócitos do tipo T tem sido estudado, principalmente em Con A e PHA (JANOSSY & GREAVES, 1971). Foi verificado um efeito regulador na síntese de imunoglobulinas do tipo IgE (KATZ et al., 1974), através de um efeito de cooperação específica dos linfócitos do tipo T sobre os linfócitos do tipo B, em determinadas fases de diferenciação das células (MELCHERS et al., 1975), regulando a resposta do tipo IgE (KISHIMOTO, 1982).

Evidências têm sido dadas sobre a existência de um mecanismo de ação das lectinas em mastócitos através das IgEs, semelhante a uma reação antígeno-anticorpo. Este fato, foi associado à utilização da Con A (KELLER, 1973). Sabe-se que a reação antígeno-anticorpo é feita através da formação de pontes entre o antígeno divalente e a porção Fab dos anticorpos adjacentes. Mas, a ação das lectinas sobre os anticorpos IgE foi sugerida como sendo uma ligação à porção Fc da IgE (MAGRO, 1974), através dos açúcares formando uma ligação cruzada entre as moléculas de IgE adjacentes

(FOREMAN, 1980), induzindo secreção celular com liberação de histamina.

As lectinas têm sido usadas para o estudo dos mecanismos pelos quais um antígeno age na superfície dos linfócitos, assim como para detectar deficiências imunológicas, nas doenças autoimunes e também para o estudo citogenético de cromosomas do homem e outros animais (SHARON & LIS, 1977).

As lectinas são proteínas, muito semelhantes a enzimas, embora destituídas de atividade catalítica, e ainda semelhantes a anticorpos, apesar de existir diferenças muito grandes entre os mesmos (SHARON & LIS, 1977).

1.3.3 - Lectinas - Toxicidade Nutricional

As lectinas encontram-se amplamente distribuídas na natureza, entre os animais e vegetais. Nos vegetais, as mais estudadas foram extraídas de plantas pertencentes às famílias das leguminosas e euforbiáceas (MOREIRA, 1975). O baixo valor nutritivo dos legumes também é atribuído à presença de lectinas, uma vez que algumas têm-se mostrado em estudos nutricionais serem altamente tóxicas; como é o caso das sementes de *Phaseolus vulgaris* que apresentam alto conteúdo em lectinas e mostraram-se muito tóxicas para o consumo animal (JAFFÉ, 1969 e PUSZTAI & PALMER, 1977), quando ingeridas sem sofrer prévio tratamento pelo calor (LIENER, 1975, LIENER, 1976a e LIENER, 1976b). JAFFÉ (1949) demonstrou que a ação tóxica do feijão cru, não seria explicada por seu baixo poder digestivo, uma vez que foi introduzida caseína à dieta, não melhorando o desempenho dos animais em experiência. Mais tarde, HONAVAR (1962) e JAFFÉ (1969) estabeleceram que a causa destes distúrbios seria a ação tóxica de uma lectina, que administrada oralmente a ratos, reduzia a absorção de todos os nutrientes. A esse respeito,

eles propuseram um mecanismo de ação que prevê a interação das lectinas com as células da superfície da parede intestinal, causando uma interferência não específica na absorção de nutrientes.

Diversas classes de proteínas vegetais são conhecidas por interferirem com o sistema digestivo de animais superiores, entre elas estão: os inibidores de tripsina, alérgenos, fitotoxinas protéicas e lectinas. As lectinas são as que melhor reagem com o trato digestivo, uma vez que possuem uma grande e específica reatividade com células contendo carboidratos de superfície ou com constituintes celulares, incluindo macromoléculas incorporadas a elementos estruturais. Mais recentemente, PUSZTAI et al. (1979) mostraram que a baixa digestibilidade das lectinas de *Phaseolus vulgaris* em ratos era devido às mesmas reagirem com células intestinais "in vivo" e causarem uma ruptura nos enterócitos, sugerindo que a toxicidade produzia efeitos sistêmicos, observados pelo incremento da excreção do nitrogênio através do catabolismo aumentado dos tecidos.

Estes efeitos tóxicos presentes nas lectinas podem ser eliminados com o uso de aquecimento adequado, inativando-as, embora algumas possam ser mais resistentes que outras (JAFFÉ & FLORES, 1975). A inativação térmica das lectinas tem sido descrita como de grande importância no aumento do valor nutricional das dietas contendo leguminosas (MUELENAERE, 1965 e JAFFÉ & GOMEZ, 1975).

1.4 - Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar a influência das proteínas solúveis de sementes de *Dioclea grandiflora* Mart., das proteínas solúveis sem lectina e da lectina purificada das mesmas sementes, exercida sobre a

resposta imunológica de camundongos. Esta resposta foi estudada tomando-se as vias oral e subcutânea para introdução das frações supostamente antigênicas e foi estimada pela determinação dos níveis séricos de IgG e IgE.

2 - MATERIAIS

2.1 - Animais

Camundongos albinos "Swiss" com idade entre 7 e 10 semanas, de ambos os sexos, trazidos do Connaught Laboratories Limited (Ontário-Canadá) para os Laboratórios Alfa-Connlab do Brasil S.A. (Fortaleza-Ceará) e mantidos em pequena colônia no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC - Fortaleza - Ceará).

Ratos albinos, adultos, machos, pesando entre 250 a 300 g, mantidos em pequena colônia no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC - Fortaleza - Ceará).

2.2 - Antígenos

As seguintes frações protéicas preparadas de sementes de *Dioclea grandiflora* Mart. (mucunã de caroço), provenientes de Maranguape (Ceará), foram utilizadas:

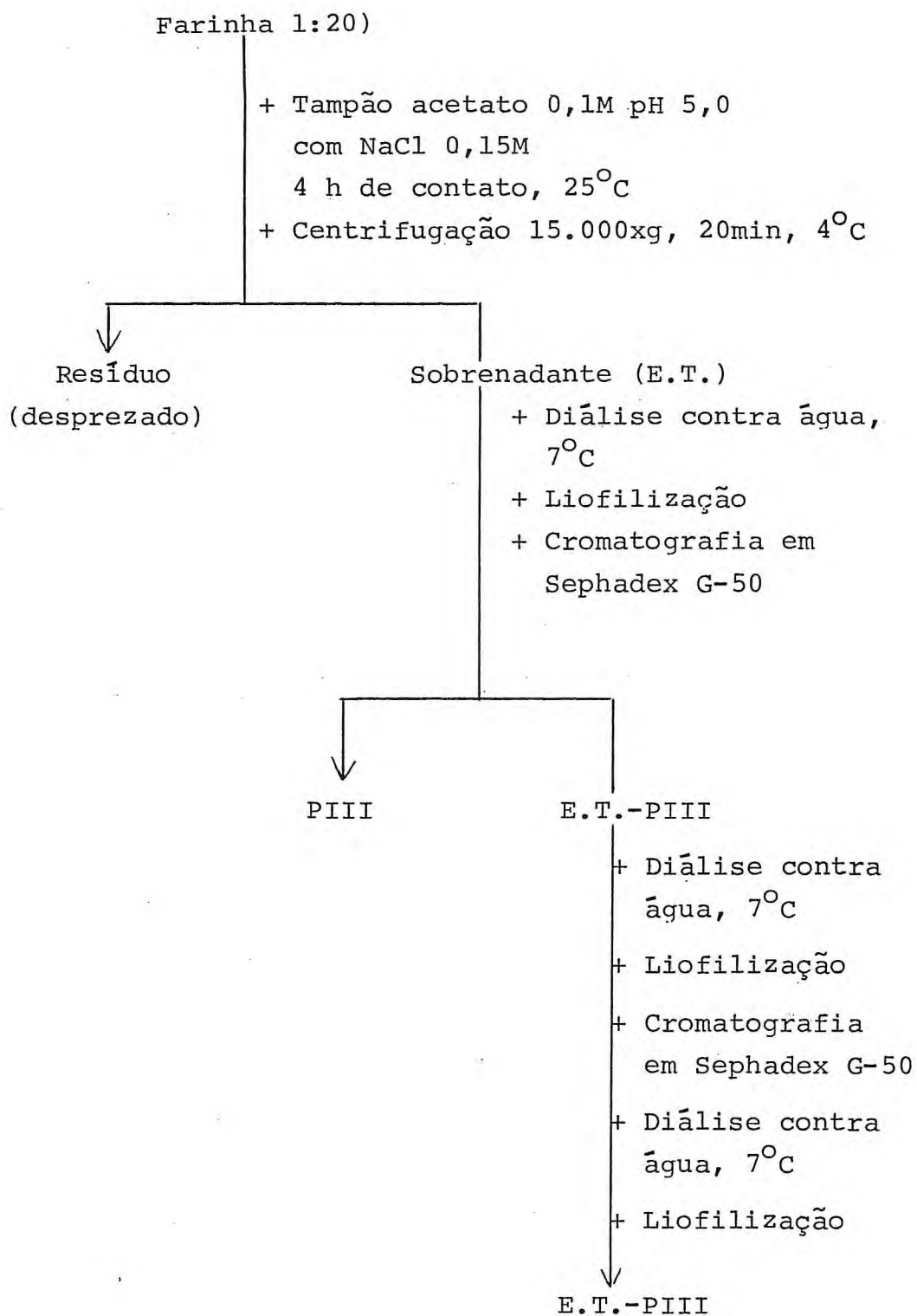
EXTRATO TOTAL (E.T.) obtida segundo HORTA-BARROS, 1982 e MOREIRA et al., 1983;

LECTINA (PIII) obtida segundo HORTA-BARROS, 1982 e MOREIRA et al., 1983;

EXTRATO TOTAL SEM LECTINA (E.T.-PIII) foi obtida de acordo com a FIGURA 4.

Inicialmente, o extrato total (E.T.) foi submetido a uma cromatografia de afinidade em coluna Sephadex G-50, medindo 26,5 X 1,5 cm, com fluxo 20 ml/h e preparada segun-

FIGURA 4 - Esquema de obtenção do extrato total sem lectina



do DETERMAN (1969). A cromatografia foi feita segundo HORTA BARROS (1982). A coluna equilibrada com NaCl 1,0 M contendo CaCl_2 5 mM e MnCl_2 5 mM, foi aplicado o extrato total (E.T.), dissolvido na mesma solução. A coluna eluída, inicialmente com a solução de equilíbrio até a obtenção de todo material não retido, seguida de tampão glicina-HCl 0,1 M pH 2,5, contendo NaCl 1,0 M com CaCl_2 5 mM e MnCl_2 5 mM, dela retirando o material que havia ficado retido. A seguir, o material eluído com NaCl 1,0 M com CaCl_2 5 mM e MnCl_2 5 mM (E.T.- PIII) foi dialisado exaustivamente contra água, liofilizado e em seguida recromatografado nas condições anteriores para excluir a possibilidade de presença de lectina.

2.3 - Teste de Hemaglutinação

O método utilizado para determinar a atividade hemaglutinante nas frações protéicas, foi o descrito por MOREIRA & PERRONE (1977) modificado para o uso de hemácias de coelho e presença de Ca^{+2} e Mn^{+2} (MOREIRA et al., 1983).

O extrato total (E.T.) e a lectina (PIII) apresentaram uma atividade hemaglutinante de 128 U.H/mg e 766 U.H/mg, respectivamente. O extrato total sem lectina (E.T.-PIII) não apresentou atividade hemaglutinante.

2.4 - Adjuvante

Foi usado como adjuvante o gel de hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) por causa do seu forte poder de adsorção de proteínas e por se mostrar o melhor adjuvante para uma resposta imunológica do tipo IgE (PROUVOST-DANON et al., 1966).

O mesmo foi misturado com as suspensões protéicas, imediatamente antes da mistura ser injetada no camundongo.

Sua preparação é a seguinte:

15 g de sulfato de amônio e alumínio ($\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) são dissolvidos em 180 ml de água destilada; em seguida são acrescentados 75 ml de NaOH 1 N, gota a gota; a solução é deixada em repouso por cerca de 24 h, um precipitado de $\text{Al}(\text{OH})_3$ é formado. O precipitado é lavado em água, 5 vezes, seguido por centrifugação a 4.000 r.p.m (centrífuga JANETZKI modelo T 32 c) durante 20 minutos. Após a última lavagem o precipitado é ressuspenso em um volume de aproximadamente 15 ml de água destilada a fim de obter um gel pipetável e espesso, tendo-se o cuidado de evitar grumos e de fazer uma boa homogenização.

Da suspensão final, foram tomadas alíquotas de 1 ml e determinado o peso seco após 24 a 48 h em estufa a 100°C . O gel foi ajustado a uma concentração de 50 ou 60 mg/ml com NaCl 0,15 M.

2.5 - Reagentes

Azul de Evans - E. Merck, Darmstadt, Alemanha.

Ovalbumina 5 vezes cristalizada (90%), Serva, Heidelberg, Alemanha Ocidental.

Sephadex G-50 fina, partículas de 20-80 μ (lote nº 0699) da Pharmacia Uppsala, Suécia.

Sulfato de amônio e alumínio ($\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) E. Merck, Darmstadt, Alemanha.

Os demais reagentes foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

3 - MÉTODOS

3.1 - Imunização por Via Subcutânea

Os camundongos foram imunizados no dorso por via subcutânea, com 0,5 ml de uma mistura contendo diferentes concentrações do antígeno e 1,0 mg do adjuvante (gel de hidróxido de alumínio) dissolvidos em salina esterilizada. No 21º e no 35º dia, a contar da data da imunização inicial, foram aplicados reforços nas mesmas condições.

3.2 - Imunização por Via Oral

Os camundongos foram alimentados através de uma sonda adaptada a uma seringa de 1,0 ml (Plastipak) com 0,2 ml de suspensões das diferentes frações protéicas (E.T., PIII e E.T.-PIII) em salina (NaCl 0,15 M) previamente esterilizada, em autoclave.

3.3 - Obtenção de Antissoros

As amostras de sangue foram coletadas com pipetas Pasteur em diferentes dias, do plexo retro-orbital, dos camundongos imunizados por via subcutânea, por via oral e por via oral mais via subcutânea. O "pool" de sangue foi deixado em repouso durante uma hora, em estufa a 37°C, para retração do coágulo. Recolhido o "pool" de soro, ele era centrifugado (International Clinical Centrifuge modelo CL 4487X-7)

por 5 (cinco) minutos, para obtenção de soro límpido, livre de hemácias, e em seguida distribuído em tubos de plástico em volume de 0,2 a 0,5 ml e armazenados a -20°C .

3.4 - Anafilaxia Cutânea Passiva

O método utilizado para as reações de anafilaxia cutânea passiva (PCA) foi descrito por OVARY (1952) e modificado por MOTA & WONG (1969).

Os títulos de PCA correspondem ao inverso da diluição máxima capaz de provocar uma reação cutânea, e foram expressos como \log_2 . Em cada teste de PCA eram realizados controles com salina e com soros de animais não imunizados.

3.4.1 - Reações de Anafilaxia Cutânea Passiva para IgE e IgG em Camundongos

Os testes para a determinação qualitativa e quantitativa de IgE e IgG foram feitos em camundogos "Swiss". A pele da região dorsal dos animais foi raspada, e as diluições dos soros injetadas intradermicamente em pontos previamente marcados, em alíquotas de 50 μl . A reação foi desencadeada 48 e 2 horas mais tarde, respectivamente para IgE e IgG, por via endovenosa, no plexo retro-orbital, com uma suspensão do antígeno específico para os anticorpos em solução de azul de Evans 0,5%. A quantidade de antígeno utilizada para o desencadeamento da PCA era de 250 μg . Os camundogos foram sacrificados 30 minutos mais tarde e a pele dissecada para a leitura da reação, feita através das manchas azuladas provocadas pelo extravasamento do corante nos sítios de injeção das diluições. As reações foram feitas usando-se animais em duplicata.

3.4.2 - Reações de Anafilaxia Cutânea Passiva para IgE em Ratos

Os testes para a determinação qualitativa e quantitativa de IgE foram feitos em ratos albinos. A pele da região dorsal dos animais, sob leve anestesia com éter, foi raspada, e as diluições dos soros foram injetadas intradermicamente em pontos previamente marcados, em alíquotas de 0,1 ml de modo a obter uma pequena pápula. Após 18 horas, foi injetado por via endovenosa, no pênis do animal, uma suspensão do antígeno específico para os anticorpos em solução de azul de Evans 0,5%. A quantidade de antígeno utilizada para o desencadeamento da PCA era de 1,0 mg. Os ratos foram sacrificados 30 minutos mais tarde e a pele dissecada para leitura da reação, feita através das manchas azuladas provocadas pelo extravasamento do corante nos sítios, onde foram injetadas as diluições dos soros contendo anticorpos a serem detectados. As reações foram feitas usando-se animais em duplicatas.

3.5 - Esquema Experimental

3.5.1 - Camundongos Imunizados por Via Subcutânea

Os camundongos foram divididos em grupos de 10 animais e imunizados com diferentes concentrações das frações protéicas imunizantes (antígenos). Foi utilizado o seguinte esquema:

- A - Grupo controle de animais não imunizados
- B - Grupo controle de camundongos imunizados com ovalbumina 100 µg

C - Grupo de extrato total (E.T.)

- C.1 - Camundongos imunizados com 0,1 μ g
- C.2 - Camundongos imunizados com 1 μ g
- C.3 - Camundongos imunizados com 10 μ g
- C.4 - Camundongos imunizados com 100 μ g

D - Grupo de lectina (PIII)

- D.1 - Camundongos imunizados com 0,1 μ g
- D.2 - Camundongos imunizados com 1 μ g
- D.3 - Camundongos imunizados com 10 μ g
- D.4 - Camundongos imunizados com 100 μ g

E - Grupo de extrato total sem lectina (E.T.-PIII)

- E.1 - Camundongos imunizados com 0,1 μ g
- E.2 - Camundongos imunizados com 1 μ g
- E.3 - Camundongos imunizados com 10 μ g
- E.4 - Camundongos imunizados com 100 μ g

Os soros da resposta primária foram obtidos com 7, 14 e 21 dias do período de desenvolvimento da imunização. O reforço foi dado no 21º dia, nas mesmas condições da imunização inicial (item 3.1). Os soros da resposta secundária foram colhidos com 28 e 35 dias (7 e 14 dias após a dose do reforço, respectivamente), contados do período da imunização subcutânea. O segundo reforço, foi dado no 35º dia (14 dias após o primeiro reforço), nas mesmas condições. Os soros foram colhidos com 42 dias (7 dias após o segundo reforço), contados da imunização inicial. Depois de coletados, os soros foram armazenados a -20°C .

3.5.2 - Camundongos Alimentados com 10 Doses do Antígeno

Os camundongos foram divididos em grupos de 10 animais aos quais foram ministrados as frações protéicas com a

ajuda de sonda (item 3.2). Afora isso, os animais foram mantidos na dieta, com a ração habitual. O seguinte esquema para introdução das frações protéicas sensibilizantes (antígenos) foi utilizado:

A - Grupo controle de camundongos alimentados com salina esterilizada.

B - Grupo de extrato total (E.T.)

B.1 - Camundongos alimentados com 100 μ g

B.2 - Camundongos alimentados com 1000 μ g

C - Grupo de lectina (PIII)

C.1 - Camundongos alimentados com 1 μ g

C.2 - Camundongos alimentados com 10 μ g

C.3 - Camundongos alimentados com 100 μ g

C.4 - Camundongos alimentados com 1000 μ g

D - Grupo de extrato total sem lectina (E.T.-PIII)

D.1 - Camundongos alimentados com 100 μ g

D.2 - Camundongos alimentados com 1000 μ g

Estes grupos foram alimentados com 10 doses, havendo um intervalo de 2 dias após as 5 primeiras doses sendo pois, de 12 dias o intervalo entre o dia "zero" e o término da alimentação com as frações proteicas. Este período corresponde à sensibilização primária. No dia "zero", ou seja, antes do início da alimentação foi feita a primeira sangria e o "pool" de soro foi obtido através de sangrias no plexo retro-orbital. A seguir, foi iniciada a imunização por via oral. Os "pools" de soros para a obtenção da resposta primária foram colhidos nos dias 17, 22, 26 e 36 (5, 10, 14 e 24 dias após a décima dose da alimentação com o antígeno, respectivamente). No 36º dia (24 dias após a décima dose da alimentação) foi iniciado um reforço, com 10 doses do antígeno, nas mesmas condições da imunização primária. Os "pools" de soros da resposta secundária foram colhidos nos

dias 50 e 54 (3 e 7 dias após a décima dose do reforço, respectivamente), contados do início da alimentação com o antígeno. Depois de coletados, os soros foram armazenados a -20°C .

3.5.3 - Camundongos Alimentados com Dose Única do Antígeno e Posterior Imunização por Via Subcutânea

Os camundongos foram divididos em grupos de 10 animais, alimentados por via oral com uma suspensão contendo 1000 μg das frações protéicas, dose única, de acordo com o seguinte esquema:

A - Grupo controle de camundongos não imunizados

B - Grupo de camundongos alimentados com extrato total (E.T.)

C - Grupo de camundongos alimentados com lectina (PIII)

D - Grupo de camundongos alimentados com extrato total sem lectina (E.T.-PIII)

Os animais eram mantidos com a ração habitual do biotério.

No dia "zero", ou seja, antes da alimentação, os camundongos foram sangrados para a obtenção de soros (item 3.3) e em seguida foram alimentados com a dose única do antígeno, 1000 μg . Os "pools" de soros para esta resposta foram colhidos com 10 e 14 dias após a administração oral do antígeno. No 14º dia estes animais foram imunizados por via subcutânea com uma suspensão contendo 100 μg do antígeno específico de cada grupo, isto é, E.T., PIII e E.T.-PIII mais 1,0 mg do adjuvante. Os "pools" de soros da resposta primária à imunização subcutânea foram obtidos com 21 e 28 dias (7 e 14 dias após a imunização subcutânea, respectiva-

mente) a contar do dia em que receberam a dose única do antígeno por via oral. No 28º dia, foi aplicado um reforço em cada grupo, de 100 µg da fração protéica. Os "pools" de soros para o estudo da resposta secundária foram obtidos nos dias 35 e 42 (7 e 14 dias após o reforço, respectivamente) após a dose oral única dos antígenos ser ministrada por via oral. Os soros coletados foram armazenados a -20°C.

4 - RESULTADOS

4.1 - Resposta do Tipo IgG e IgE em Camundongos Imunizados por Via Subcutânea com 100 µg de Ovalbumina

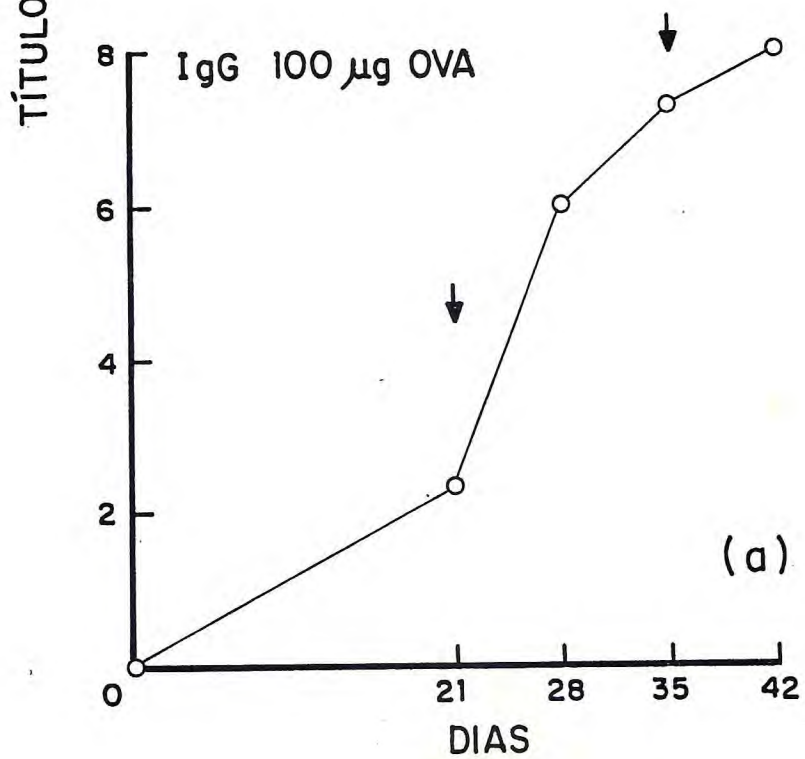
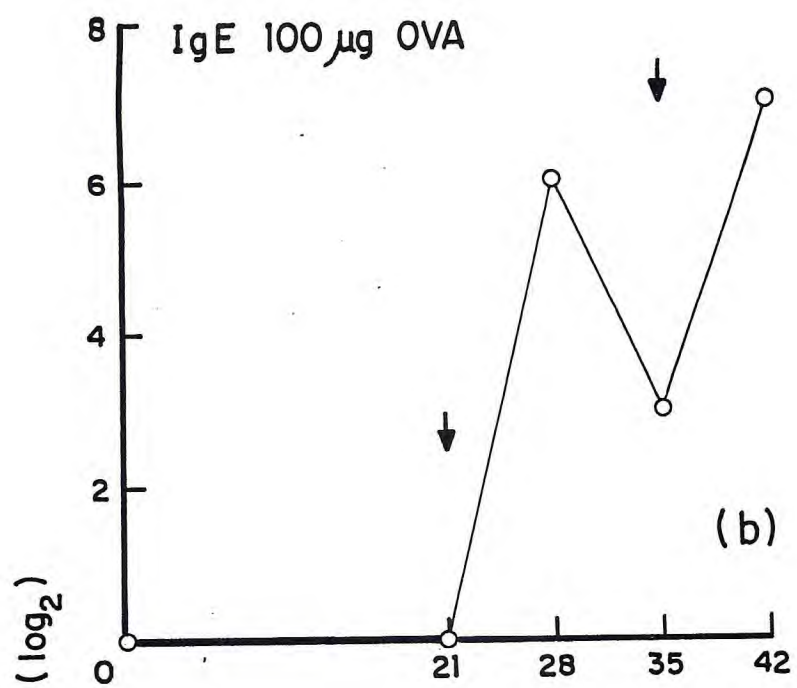
Os títulos de PCA para a resposta do tipo IgG obtidos pela imunização de camundongos por via subcutânea com 100 µg de ovalbumina, são mostrados na FIGURA 5a. Quando a PCA para estes soros foi desencadeada com ovalbumina, obteve-se um título de 2,3 para a resposta primária com 21 dias, elevando-se após o primeiro reforço, alcançado um título de 8 com 42 dias (7 dias após o segundo reforço). Estes dados mostram um perfil clássico para a resposta do tipo IgG, que aumenta com o tempo de imunização e com os reforços, embora os títulos revelados tenham sido baixos.

Os títulos de PCA para a resposta do tipo IgE obtidos pela imunização de camundongos por via subcutânea com 100 µg de ovalbumina, são mostrados na FIGURA 5b. Quando a PCA para estes soros foi desencadeada com ovalbumina, não foram revelados títulos de PCA para a resposta primária, revelando-se em secundária, com 28 dias (7 dias após o primeiro reforço) no valor de 6 que caiu com 35 dias e atingiu o valor de 7 com 42 dias (7 dias após o segundo reforço). Estes dados mostram um perfil clássico para a resposta do tipo IgE, que aumenta inicialmente para diminuir em seguida, aumentando com o reforço. Como no caso da resposta do tipo IgG, os títulos de IgE também foram baixos.

FIGURA 5 - Resposta do tipo IgG e IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 100 μ g de ovalbumina.

a) PCA desencadeada em camundongos para IgG com 2 horas de latência, após injeção intradérmica das diferentes diluições dos soros, com 250 μ g de ovalbumina.

b) PCA desencadeada em ratos para IgE com 18 horas de latência, após injeção intradérmica das diferentes diluições dos soros, com 2,0 mg de ovalbumina. As setas da figura indicam os dias dos reforços.



4.2 - Resposta do Tipo IgG em Camundongos Imunizados por Via Subcutânea com Frações Protéicas de *Dioctlea grandiflora* Mart.

4.2.1 - Extrato total

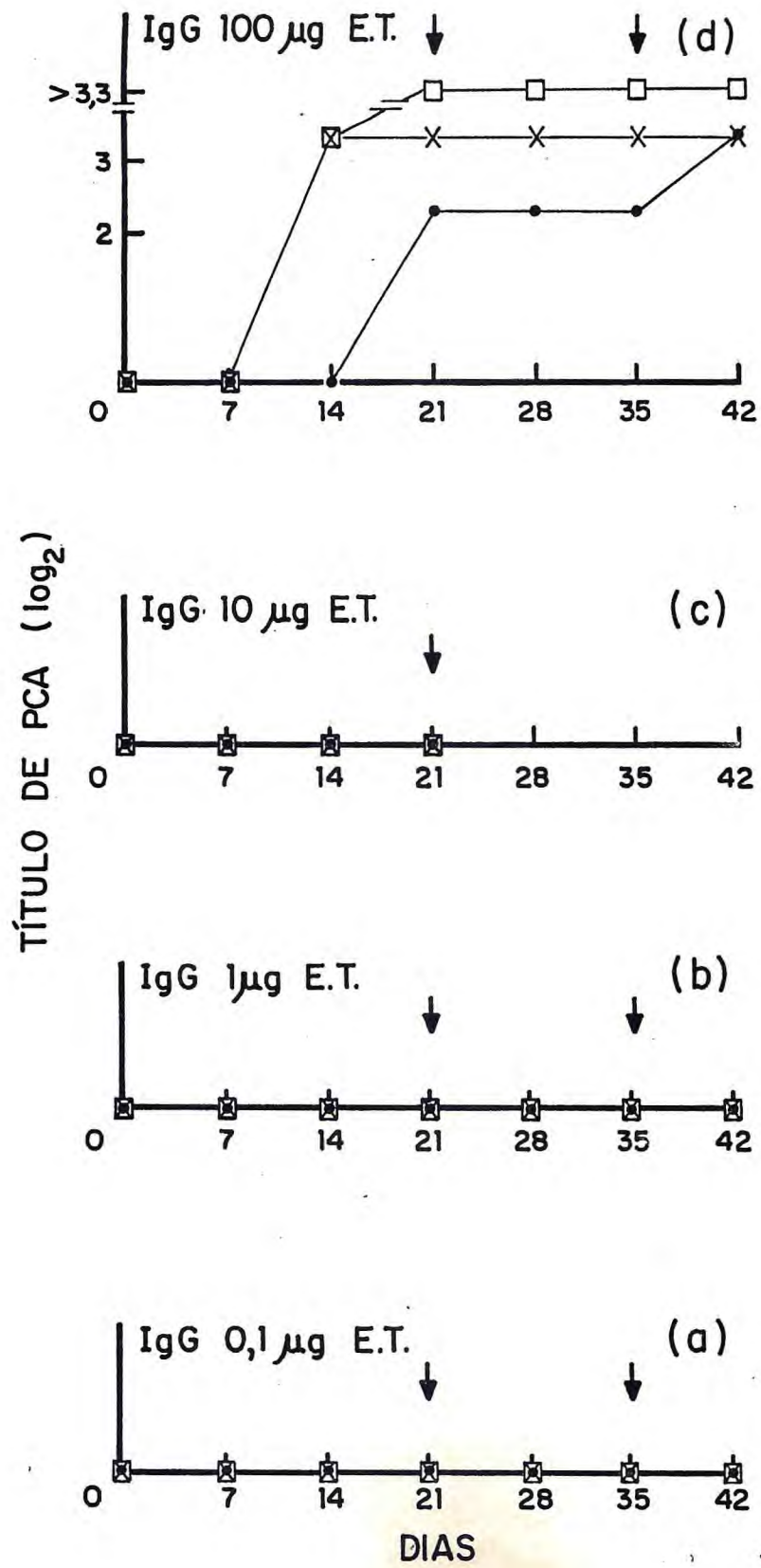
Os títulos de PCA obtidos pela imunização de camundongos por via subcutânea com 0,1, 1, 10 e 100 µg de extrato total (E.T.), são mostrados na FIGURA 6. Para os camundongos imunizados com 0,1 e 1 µg de E.T. a síntese de IgG não foi revelada nem na resposta primária, nem na resposta secundária, por PCA desencadeada com os antígenos E.T., PIII e E.T.-PIII. Para os camundongos imunizados com 10 µg de E.T., a síntese de IgG não foi revelada na resposta primária desencadeada com os antígenos E.T., PIII e E.T.-PIII. Para os camundongos imunizados com 100 µg de E.T., uma dose considerada alta, títulos de PCA foram revelados na resposta primária. Quando a PCA para estes soros (imunização com 100 µg), foi desencadeada com o antígeno específico (E.T.), obteve-se um título de 3,3 com 14 dias, a contar da data da imunização inicial e com 21 dias revelou-se com valores maiores que 3,3, mantendo-se inalterado após os reforços. A PCA realizada com estes mesmos soros (100 µg) e desencadeada com E.T.-PIII, revelou um título de 3,3 com 14 dias após a imunização inicial; os reforços não alteraram este título. Quando a PCA para estes mesmos soros (imunização com 100 µg) foi desencadeada com PIII, observou-se que até o 14º dia após a imunização inicial não houve resposta do tipo IgG anti-PIII e, um título de 2,3 foi revelado com 21 dias da imunização inicial, o mesmo se manteve inalterado após o primeiro reforço, elevando-se para 3,3 após o segundo.

Nestes resultados observamos que a resposta do tipo IgG induzida pela imunização com extrato total (E.T.),

FIGURA 6 - Resposta do tipo IgG em camundongos imunizados por via subcutânea com E.T. (*Dioclea grandiflora* Mart.):

a) 0,1 µg b) 1,0 µg c) 10 µg d) 100 µg

PCA desencadeada em camundongos com 2 horas de latência, após injeção intradérmica das diferentes diluições dos soros, com 250 µg de E.T. (□—□), 250 µg de E.T.-PIII (X—X) e 250 µg de PIII (●—●). As setas da figura indicam os dias dos reforços.



desencadeada com E.T. representa a obtenção de títulos mais elevados o que, a grosso modo, demonstra o somatório dos títulos de PCAs desencadeadas com E.T.-PIII e PIII.

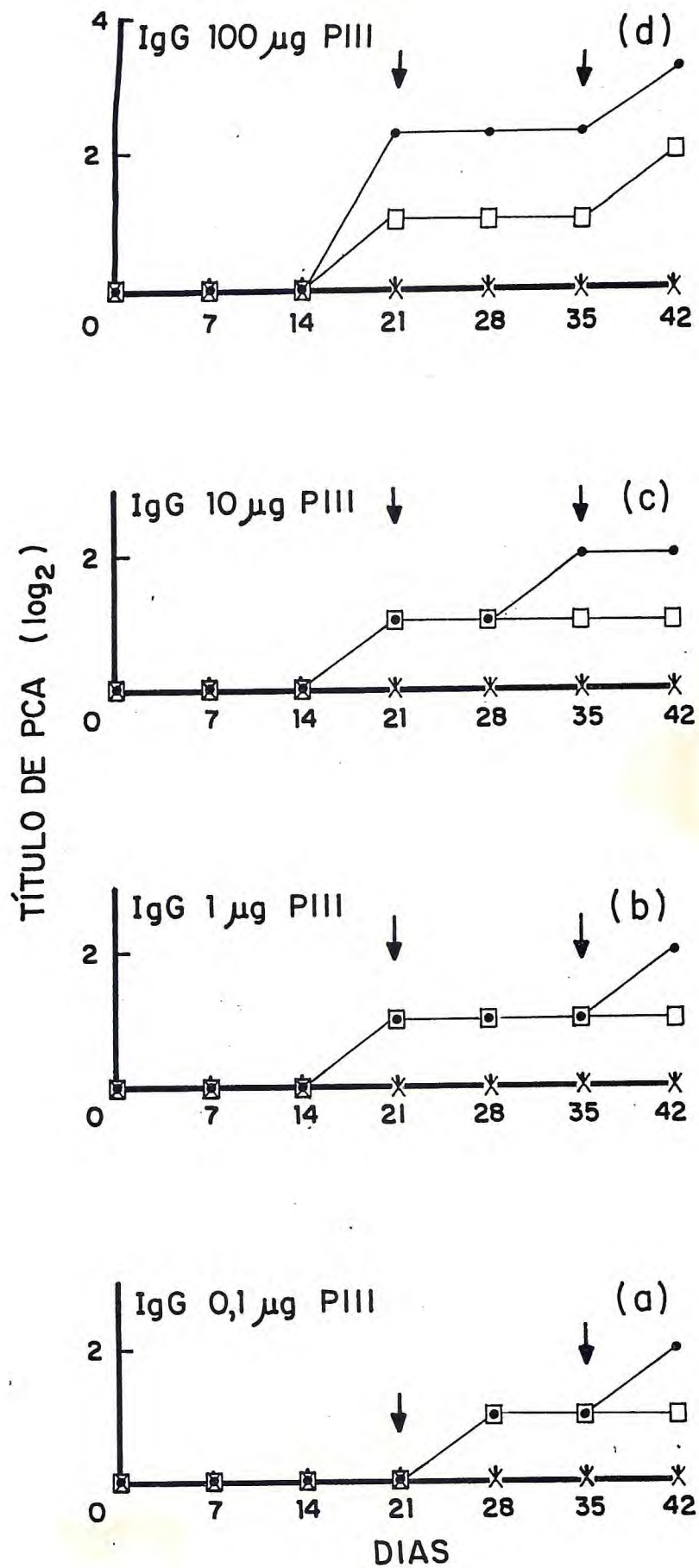
4.2.2 - Lectina

Os títulos de PCA obtidos pela imunização de camundongos por via subcutânea com 0,1, 1, 10 e 100 μg de lectina (PIII), são mostrados na FIGURA 7. Em camundongos imunizados com 0,1 μg de PIII os títulos de PCA desencadeados com PIII (antígeno específico) foram revelados 28 dias após a imunização (7 dias após o primeiro reforço) com um valor de 1, mantendo-se inalterado com 35 dias e elevando-se para 2 com 42 dias (7 dias após o segundo reforço). Quando a PCA para estes soros (imunização com 0,1 μg) foi desencadeada com E.T., um título de 1 foi revelado com 28 dias (7 dias após o primeiro reforço), mantendo-se inalterado mesmo após um segundo reforço. Para os soros de camundongos imunizados com 1 μg de PIII, os títulos de PCA foram revelados com PIII ainda em primária, com 21 dias após a imunização, com um valor de 1, que se manteve inalterado após o primeiro reforço, elevando-se a 2 com 7 dias após um segundo reforço. Quando a PCA para estes soros (imunização com 1 μg) foi desencadeada com E.T., um título de 1 foi revelado em primária com 21 dias, que se manteve inalterado após os reforços. Para os camundongos imunizados com 10 μg de PIII, os títulos de PCA foram revelados com PIII (antígeno específico), também em primária com 21 dias com valor de 1, que se manteve com 28 dias, elevando-se para 2 com 35 dias e mantendo-se inalterado após o segundo reforço. Quando a PCA para estes soros (imunização com 10 μg) foi desencadeada com E.T., um título de 1 foi revelado em primária com 21 dias, que se manteve inalterado após os reforços. Para os camundongos

FIGURA 7 - Resposta do tipo IgG em camundongos imunizados por via subcutânea com PIII (*Dioclea grandiflora* Mart.):

a) 0,1 μ g b) 1,0 μ g c) 10 μ g d) 100 μ g

PCA desencadeada em camundongos com 2 horas de latência, após a injeção intradérmica das diferentes diluições dos soros, com 250 μ g de E.T. (□—□), 250 μ g de E.T.-PIII (X—X) e 250 μ g de PIII (●—●). As setas da figura indicam os dias dos reforços.



imunizados com 100 μ g de PIII com PCA desencadeada com PIII, um título de 2,3 foi detectado com 21 dias ainda em primária), elevando-se a 3,3 com 42 dias (7 dias após o segundo reforço). Quando a PCA para estes soros (imunização com 100 μ g) foi desencadeada com E.T., um título de 1 foi revelado com 21 dias, elevando-se a 2 com 42 dias.

Para as PCAs desencadeadas com E.T.-PIII não foram revelados títulos, demonstrando a não existência de resposta cruzada entre E.T.-PIII e PIII, como era de se esperar.

Nestes resultados observamos que a resposta induzida pela imunização com PIII, quando desencadeada com E.T. mostra-se mais baixa do que a resposta revelada com PIII (antígeno específico) após o segundo reforço, nos quatro esquemas de sensibilização. Isto se deve ao fato de que o E.T. contém cerca de 10% do antígeno específico (PIII). Ainda este dado é enfatizado no caso do desencadeamento com E.T.-PIII que não revela presença de IgG por não conter o antígeno específico.

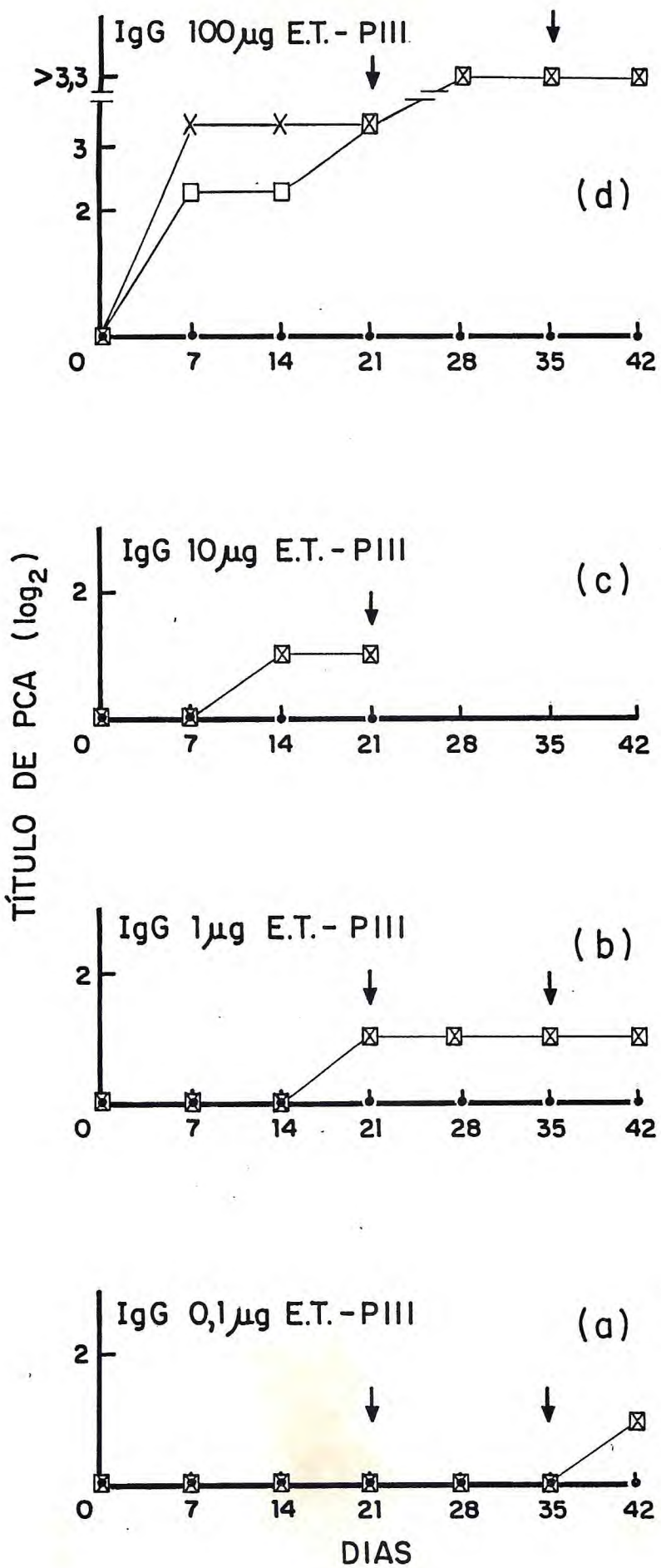
4.2.3 - Extrato total sem lectina

Os títulos de PCA obtidos pela imunização de camundongos por via subcutânea com 0,1, 1, 10 e 100 μ g de extrato total sem lectina, são mostrados na FIGURA 8. Para as PCAs desencadeadas com E.T. e E.T.-PIII com soros de camundongos imunizados com 0,1 μ g de E.T.-PIII, só foram revelados títulos de PCA com 42 dias após a imunização inicial (7 dias após o segundo reforço), com valores de 1. Para os soros de camundongos imunizados com 1 μ g de E.T.-PIII, com PCAs desencadeadas com E.T. e E.T.-PIII, títulos de 1 foram revelados com 21 dias após imunização inicial que se mantiveram inalterados mesmo após reforços. Para os soros de camundongos imunizados com 10 μ g de E.T.-PIII, títulos de PCA

FIGURA 8 - Resposta do tipo IgG em camundongos imunizados por via subcutânea com E.T.-PIII (*Dioclea grandiflora* Mart.):

a) 0,1 μg b) 1,0 μg c) 10 μg d) 100 μg

PCA desencadeada em camundongos com 2 horas de latência, após a injeção intradérmica das diferentes diluições dos soros, com 250 μg de E.T. (\square — \square), 250 μg de E.T.-PIII (X—X) e 250 μg de PIII (\bullet — \bullet). As setas da figura indicam os dias dos reforços.



anti-E.T. e anti-E.T.-PIII foram revelados com 14 dias, mantendo-se com 21 dias com valores de 1. Quando a PCA para os soros de camundongos imunizados com 100 µg de E.T.-PIII foi desencadeada com E.T.-PIII (antígeno específico), foi revelado um título de 3,3 para a resposta primária com 7 dias contados da imunização inicial, que se manteve inalterado com 14 e 21 dias e, atingindo um título acima de 3,3 com 28 dias (7 dias após o primeiro reforço), que se manteve inalterado com 42 dias (7 dias após o segundo reforço). Para a PCA realizada com estes mesmos soros (imunização com 100 µg) e desencadeada com E.T., obteve-se um título de 2,3 com 7 dias contados da imunização inicial, que se manteve com 14 dias, elevando-se para 3,3 com 21 dias, ainda em primária. Os reforços aumentaram este título para valores maiores que 3,3. Para as PCAs desencadeadas com PIII, os resultados foram negativos ao longo de todo o período experimental.

Estes resultados mostram que a pequena diferença entre os títulos de PCA quando são desencadeados com E.T.-PIII (antígeno específico) e com E.T. no período inicial (animais sensibilizados com 100 µg) pode ser atribuída à pequena diferença de concentração do antígeno em E.T., que é cerca de 10% menor do que o E.T.-PIII. Não foi revelada síntese de IgG, quando foi usado PIII como agente desencadeante, uma vez que PIII não estava presente na imunização.

4.3 - Resposta do Tipo IgE em Camundongos Imunizados por Via Subcutânea com Frações Protéicas de *Dioclea grandiflora* Mart.

4.3.1 - Extrato total

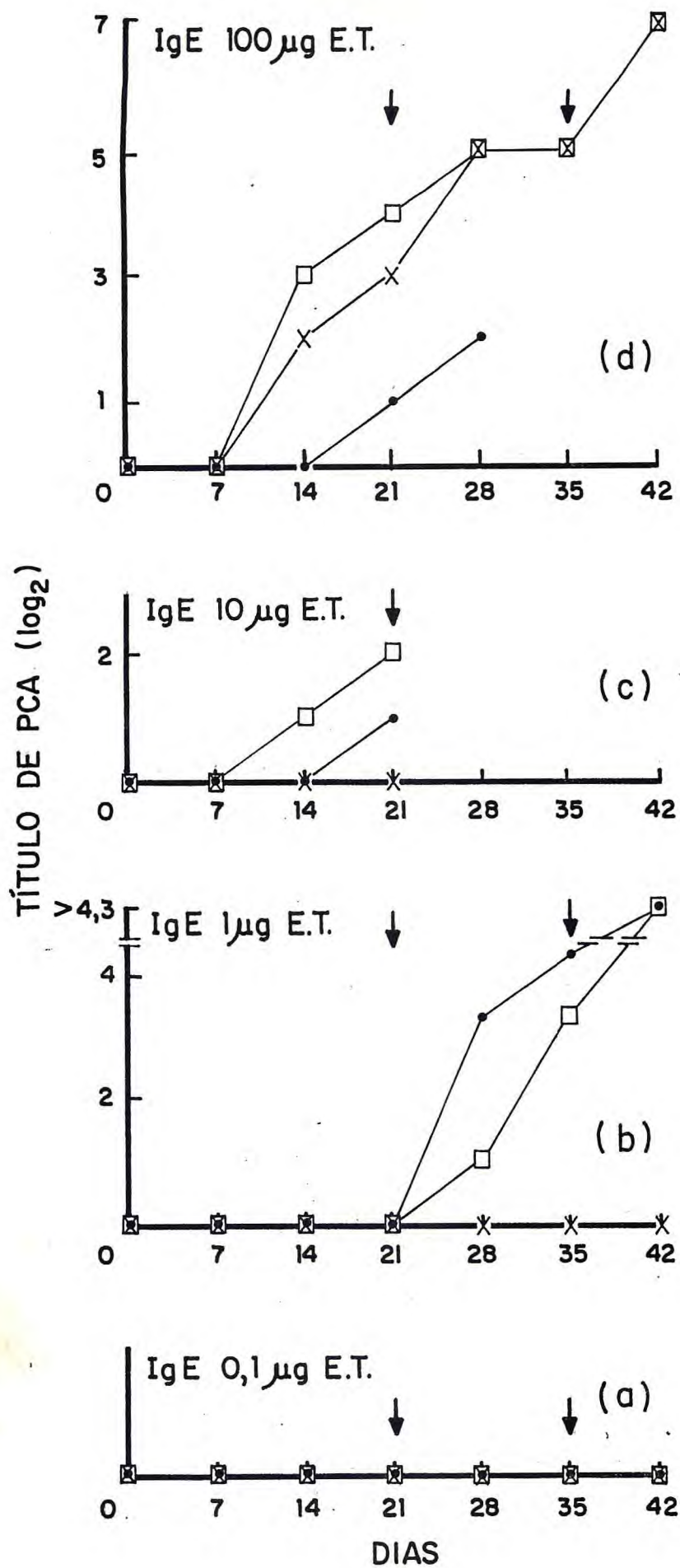
Os títulos de PCA obtidos pela imunização de camundongos por via subcutânea com 0,1, 1, 10 e 100 µg de extra-

to total (E.T.) para a resposta do tipo IgE, são mostrados na FIGURA 9. Não foram revelados títulos de PCA para os camundongos imunizados com 0,1 μ g de E.T., quando as PCAs foram desencadeadas com E.T., PIII e E.T.-PIII, para a resposta primária e para a resposta secundária. Em camundongos imunizados com 1 μ g de E.T. com PCA desencadeada com E.T., um título de 1 foi revelado com 28 dias, aumentando para 3,3 com 35 dias e, elevando-se para valores maiores que 4,3 com 42 dias (7 dias após o segundo reforço). Os títulos de PCA para estes mesmos soros (imunização com 1 μ g) obtidos com PCA desencadeada com PIII foram revelados 7 dias após o primeiro reforço (28 dias), com um título de 3,3, elevando-se para 4,3 com 35 dias e alcançando valores maiores que 4,3 com 42 dias (7 dias após o segundo reforço). Para estes mesmos soros (imunização com 1 μ g) não foram revelados títulos de PCA com o antígeno desencadeante E.T.-PIII. Para os camundongos imunizados com 10 μ g de E.T., os títulos de PCA desencadeados com o antígeno específico foram revelados com 14 dias após a imunização inicial com valor de 1, elevando-se a 2 com 21 dias após a imunização. Para estes mesmos soros (imunização com 10 μ g) com PCA desencadeada com PIII, títulos foram revelados com 21 dias após a imunização subcutânea, com valor de 1, não sendo para os mesmos revelados títulos de PCA quando desencadeados com E.T.-PIII. Para os camundongos imunizados com 100 μ g de E.T., os títulos de PCA desencadeados com o antígeno específico (E.T.) foram revelados 14 dias após a imunização inicial com um título de 3, elevando-se para 4 com 21 dias, chegando a 5 com 28 dias (7 dias após o primeiro reforço) e a 7 com 42 dias (7 dias após o segundo reforço). Para a PCA destes mesmos soros (imunização com 100 μ g) desencadeada com E.T.-PIII um título de 2 foi revelado com 14 dias após a imunização inicial, um de 3 com 21 dias, elevando-se para 5 com 28 dias (7 dias após o primeiro reforço) e a 7 com 42 dias (7 dias após o segundo reforço). Títulos de PCA

FIGURA 9 - Resposta do tipo IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com E.T. (*Dioclea grandiflora* Mart.):

a) 0,1 µg b) 1,0 µg c) 10 µg d) 100 µg

PCA desencadeada em ratos com 18 horas de latência, após injeção intradérmica das diferentes diluições dos soros, com 1,0 mg de E.T. (□—□), 1,0 mg de E.T.-PIII (X—X) e 1,0 mg de PIII (●—●). As setas da figura indicam os dias dos reforços.



para a resposta do tipo IgE anti-PIII, para estes mesmos soros foram revelados com 21 dias com valor de 1, elevando-se a 2 com 28 dias (7 dias após primeiro reforço).

Os resultados obtidos pela imunização com E.T. mostram que a resposta do tipo IgE anti-PIII revelou-se mais alta do que a resposta do tipo IgE anti-E.T. (antígeno específico), quando a imunização foi feita com baixa dose de E.T. (imunização com 1 μ g). A PCA negativa quando desencadeada com E.T.-PIII é justificada pela não existência de PIII na referida fração protéica. Quando as concentrações de E.T. foram mais elevadas (10 e 100 μ g), os títulos de PCA obedeceram ao padrão, isto é, os maiores títulos são revelados com o antígeno específico.

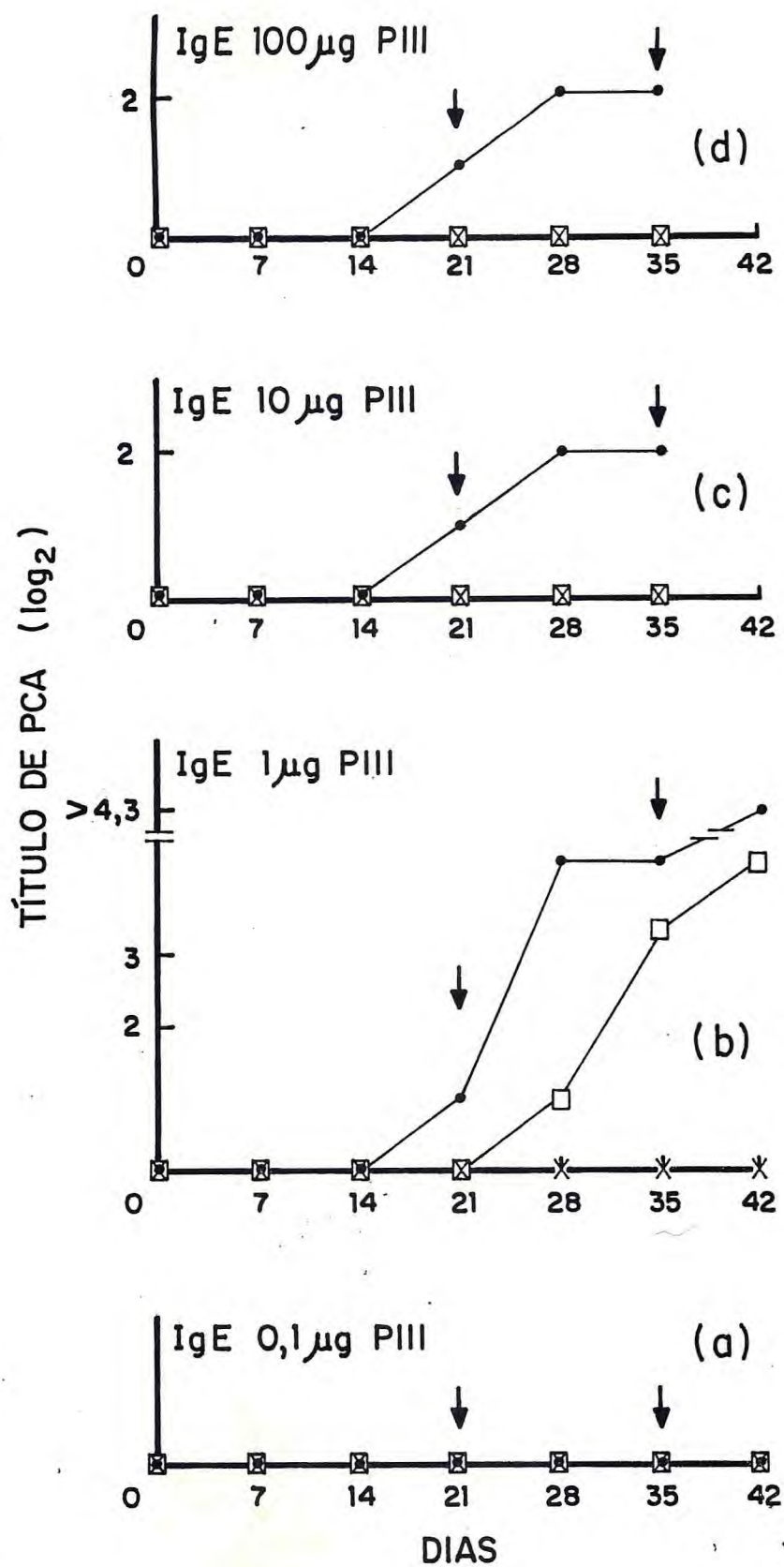
4.3.2 - Lectina

Os títulos de PCA obtidos pela imunização de camundongos por via subcutânea com 0,1, 1, 10 e 100 μ g de lectina (PIII) para a resposta do tipo IgE, são mostrados na FIGURA 10. Não foram revelados títulos de PCA para os camundongos imunizados com 0,1 μ g de PIII quando as PCAs foram desencadeadas com E.T., PIII e E.T.-PIII, para a resposta primária, bem como para a resposta secundária. Em camundongos imunizados com 1 μ g de PIII os títulos de PCA desencadeados com PIII (antígeno específico) foram revelados com 21 dias após a imunização inicial, com valor de 1, elevando-se para 4,3 com 28 dias (7 dias após primeiro reforço) e chegando a valores maiores que 4,3 com 42 dias (7 dias após segundo reforço). Os títulos de PCA para estes mesmos soros desencadeados com E.T., foram revelados com 28 dias (7 dias após primeiro reforço) com valor de 1, elevando-se para 3,3 com 35 dias e atingindo um valor de 4,3 com 42 dias (7 dias após o segundo reforço). Para estes mesmos soros não foram

FIGURA 10 - Resposta do tipo IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com PIII (*Dioclea grandiflora* Mart.):

a) 0,1 μ g b) 1,0 μ g c) 10 μ g d) 100 μ g

PCA desencadeada em ratos com 18 horas de latência, após injeção intradérmica das diferentes diluições dos soros, com 1,0 mg de E.T. (\square — \square), 1,0 mg de E.T.-PIII (X—X) e 1,0 mg de PIII (\bullet — \bullet). As setas na figura indicam os dias dos reforços.



revelados títulos de PCA quando desencadeados com E.T.-PIII. Para os camundongos imunizados com 10 μ g de PIII, os títulos de PCA desencadeados com o antígeno específico (PIII) foram revelados com 21 dias após a imunização inicial, com valor de 1, que se elevou a 2 com 28 dias (7 dias após primeiro reforço), mantendo-se inalterado com 35 dias. Para estes mesmos soros, não foram revelados títulos de PCA desencadeados com E.T. e E.T.-PIII. Para os camundongos imunizados com 100 μ g de PIII, os títulos de PCA desencadeados com PIII (antígeno específico) foram revelados 21 dias após a imunização inicial, com valor de 1 e elevando-se para 2 com 28 dias (7 dias após primeiro reforço), que se manteve inalterado com 35 dias após a imunização inicial. Para estes mesmos soros, não foram revelados títulos de PCA desencadeados com E.T. e E.T.-PIII.

Estes dados mostram que os títulos de PCA obtidos para a resposta do tipo IgE anti-PIII revelam uma melhor resposta para o antígeno específico. O fato de que a IgE anti-E.T. não foi revelada em camundongos imunizados com 10 e 100 μ g de PIII é atribuída à existência de uma baixa sensibilização com PIII em doses mais elevadas, indicando que PIII mesmo quando presente em cerca de 10%, não é capaz de revelar uma resposta, o que seria de esperar diante dos resultados obtidos com 1 μ g de PIII. O caso de E.T.-PIII é explicado pela ausência do antígeno específico.

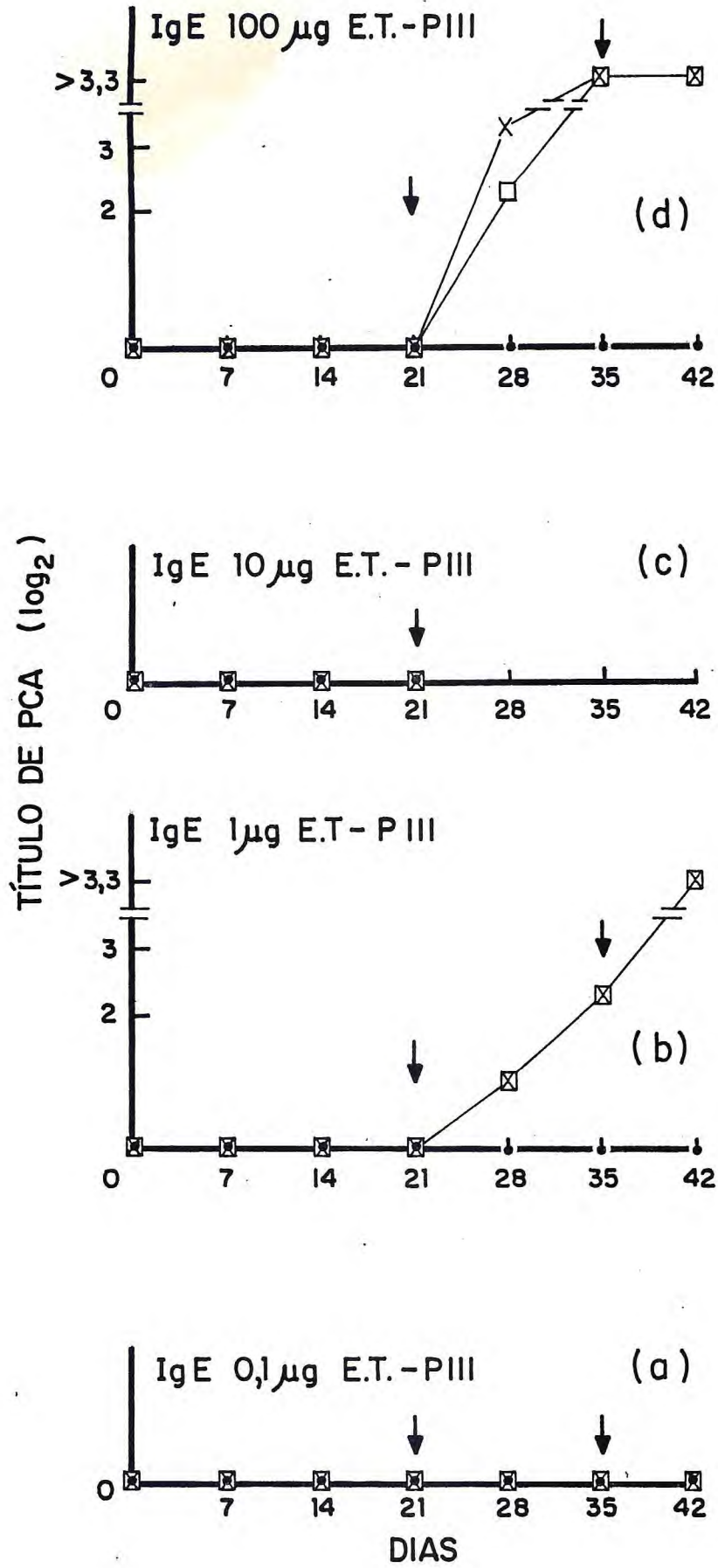
4.3.3 - Extrato total sem lectina

Os títulos de PCA obtidos pela imunização de camundongos por via subcutânea com 0,1, 1, 10 e 100 μ g de extrato total sem lectina (E.T.-PIII) para a resposta do tipo IgE, são mostrados na FIGURA 11. Não foram revelados títulos de PCA para os camundongos imunizados com 1,0 μ g de

FIGURA 11 - Resposta do tipo IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com E.T.-PIII (*Dioclea grandiflora* Mart.):

a) 0,1 μ g b) 1 μ g c) 10 μ g d) 100 μ g

PCA desencadeada em ratos com 18 horas de latência, após a injeção intradérmica das diferentes diluições dos soros, com 1,0 mg de E.T. (\square — \square), 1,0 mg de E.T.-PIII (X—X) e 1,0 mg de PIII (\bullet — \bullet). As setas da figura indicam os dias dos reforços.



E.T.-PIII quando as PCAs foram desencadeadas com E.T., PIII e E.T.-PIII, para a resposta do tipo IgE em primária e em secundária. Em camundongos imunizados com 1 μ g de E.T.-PIII, os títulos de PCA desencadeados com o antígeno específico (E.T.-PIII), foram revelados com 28 dias (7 dias após o primeiro reforço) com valor de 1, elevando-se para 2,3 com 35 dias e alcançando um título com valores acima de 3,3 com 42 dias (7 dias após segundo reforço). Os títulos de PCA para estes mesmos soros (imunização com 1 μ g) desencadeados com E.T., mostraram-se semelhantes aos obtidos com E.T.-PIII, para todos os dias testados. Para estes mesmos soros não foram revelados títulos de PCA, quando desencadeados com PIII. Para os camundongos imunizados com 10 μ g de E.T.-PIII não foram revelados títulos de PCA desencadeados com E.T., PIII e E.T.-PIII com 14 e 21 dias após a imunização inicial. Para os camundongos imunizados com 100 μ g de E.T.-PIII os títulos de PCA desencadeados com o antígeno específico E.T.-PIII, foram revelados com 28 dias (7 dias após primeiro reforço) com valor de 3,3 e elevando-se para valores maiores que 3,3 com 35 dias, mantendo-se inalterado com 42 dias (7 dias após segundo reforço). Para a PCA destes mesmos soros desencadeada com E.T. um título de 2,3 foi revelado com 28 dias (7 dias após primeiro reforço), elevando-se para valores maiores que 3,3 com 35 dias, que se manteve inalterado com 42 dias (7 dias após o segundo reforço). Não foram revelados títulos de PCA para estes soros desencadeados com PIII.

Estes resultados mostram que a pequena diferença entre os títulos de PCA quando são desencadeados com E.T.-PIII (antígeno específico) e com E.T. no período inicial (animais imunizados com 100 μ g) pode ser atribuída à pequena diferença de concentração do antígeno em E.T., que deverá ser 10% menor do que o E.T.-PIII. Não foi revelada síntese de IgE anti-PIII uma vez que PIII não estava presente na imunização.

4.4 - Resposta do Tipo IgG em Camundongos Alimentados com 10 Doses de Frações Proteicas de *Dioclea grandiflora* Mart.

4.4.1 - Extrato total

4.4.1.1 - Extrato total 100 µg

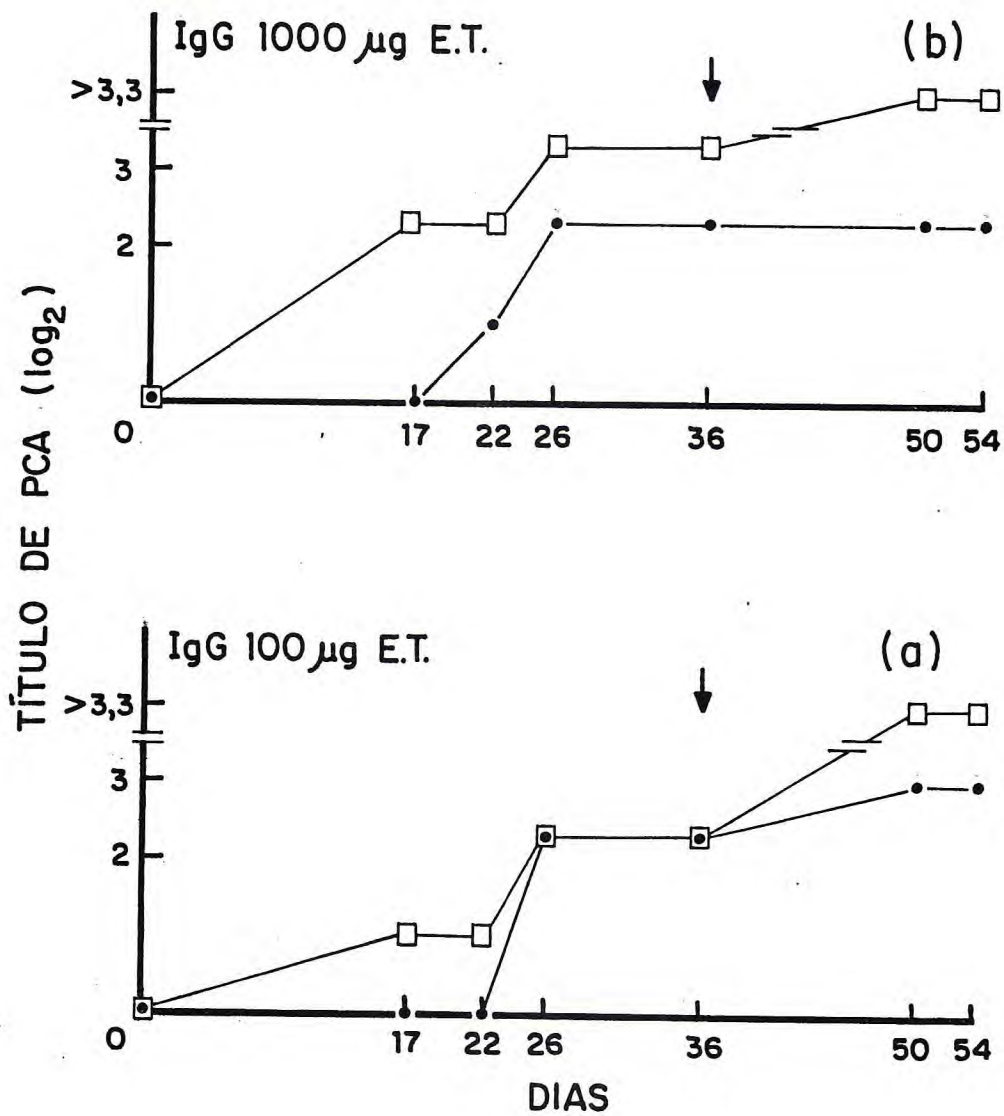
Os resultados obtidos pela alimentação de camundongos com 100 µg de extrato total (E.T.) para a resposta do tipo IgG, são mostrados na FIGURA 12 a. Quando a PCA para estes soros foi desencadeada com o antígeno específico (E.T.), foi detectado um título de 1 para a resposta primária com 17 dias (5 dias após a décima dose da alimentação), mantendo-se com 22 dias, elevando-se para 2,3 com 26 dias (14 dias após a décima dose da alimentação), mantendo-se com 36 dias (24 dias após a décima dose da alimentação). No 50º dia (3 dias após a décima dose do reforço) foi detectado um título com valor maior que 3,3, que se manteve inalterado com 54 dias (7 dias após a décima dose do reforço). Quando a PCA foi desencadeada com PIII, não foram revelados títulos de PCA para a resposta do tipo IgG anti-PIII com 17 e 22 dias (5 e 10 dias após a décima dose da alimentação, respectivamente). No 26º dia foi revelado um título de 2,3, que se manteve inalterado no 36º dia. No 50º dia (3 dias após a décima dose do reforço) foi detectado um título de 3,3, que se manteve inalterado com 54 dias (7 dias após a décima dose do reforço).

Estes dados revelam que títulos mais elevados são obtidos com PCAs desencadeadas com o antígeno específico.

FIGURA 12 - Resposta do tipo IgG em camundongos alimentados com 10 doses de E.T. (*Dioclea grandiflora* Mart.):

a) 100 μ g b) 1000 μ g

PCA desencadeada em camundongos com 2 horas de latência, após a injeção intradérmica das diferentes diluições dos soros, com 250 μ g de E.T. (\square — \square) e 250 μ g de PIII (\bullet — \bullet). A seta da figura indica o início do reforço.



4.4.1.2 - Extrato total 1000 μg

Os resultados obtidos pela alimentação de camundongos com 1000 μg de extrato total (E.T.) para a resposta do tipo IgG, são mostrados na FIGURA 12 b. Para a PCA destes soros desencadeada com o antígeno específico (E.T.), foram revelados títulos de 2,3 nos dias 17 e 22 (5 e 10 dias após a décima dose da alimentação, respectivamente). Um título de 3,3 foi revelado no 26º dia (14 dias após a décima dose da alimentação), que se manteve inalterado com 36 dias (24 dias após a décima dose da alimentação). Nos dias 50 e 54 (3 e 7 dias após a décima dose do reforço, respectivamente) foram detectados para ambos um título com valor acima de 3,3. Para a PCA desencadeada com PIII os títulos de PCA foram detectados a partir do 22º dia (10 dias após a décima dose da alimentação) com valor de 1. Nos dias 26 e 36 (14 e 24 dias após a décima dose da alimentação, respectivamente) foram revelados títulos no valor de 2,3, que se mantiveram inalterados com 50 e 54 dias (3 e 7 dias após a décima dose do reforço, respectivamente).

Estes dados revelam que títulos mais elevados são obtidos com PCAs desencadeadas com o antígeno específico e que doses mais elevadas do antígeno sensibilizante (1000 μg) revelam uma melhor resposta. Chama a atenção o fato de que, a resposta do tipo IgG anti-PIII em animais imunizados com 1000 μg de E.T. as doses de reforço não foram eficazes para elevar esta resposta, demonstrando a existência de uma concentração ótima para tal, 100 μg de E.T.

4.4.2 - Lectina

4.4.2.1 - Lectina 1 μg

Os resultados das PCAs para a resposta do tipo IgG em camundongos alimentados com 10 doses de 1 μ g de lectina (PIII), foram negativos.

4.4.2.2 - Lectina 10 μ g

Os camundongos alimentados com 10 doses diárias de 10 μ g de PIII também apresentaram resultados negativos, para as determinações dos títulos de PCA para a resposta do tipo IgG.

4.4.2.3 - Lectina 100 μ g

Os resultados obtidos pela alimentação de camundongos com 100 μ g de lectina (PIII) para a resposta do tipo IgG, são mostrados na FIGURA 13 a. Quando a PCA para estes soros foi desencadeada com o antígeno específico (PIII), títulos de PCA foram revelados com 22 dias (10 dias após a décima dose da alimentação) com um valor de 2,3, que se manteve inalterado até o 36º dia (24 dias após a décima dose da alimentação). Com 50 dias (3 dias após a décima dose do reforço) foi detectado um título de 1, que se manteve inalterado com 54 dias (7 dias após a décima dose do reforço). Títulos de PCA para a resposta do tipo IgG anti-E.T. para estes mesmos soros, foram revelados a partir do 22º dia (10 dias após a décima dose da alimentação) com valor de 1, que se mantiveram inalterados mesmo após o reforço.

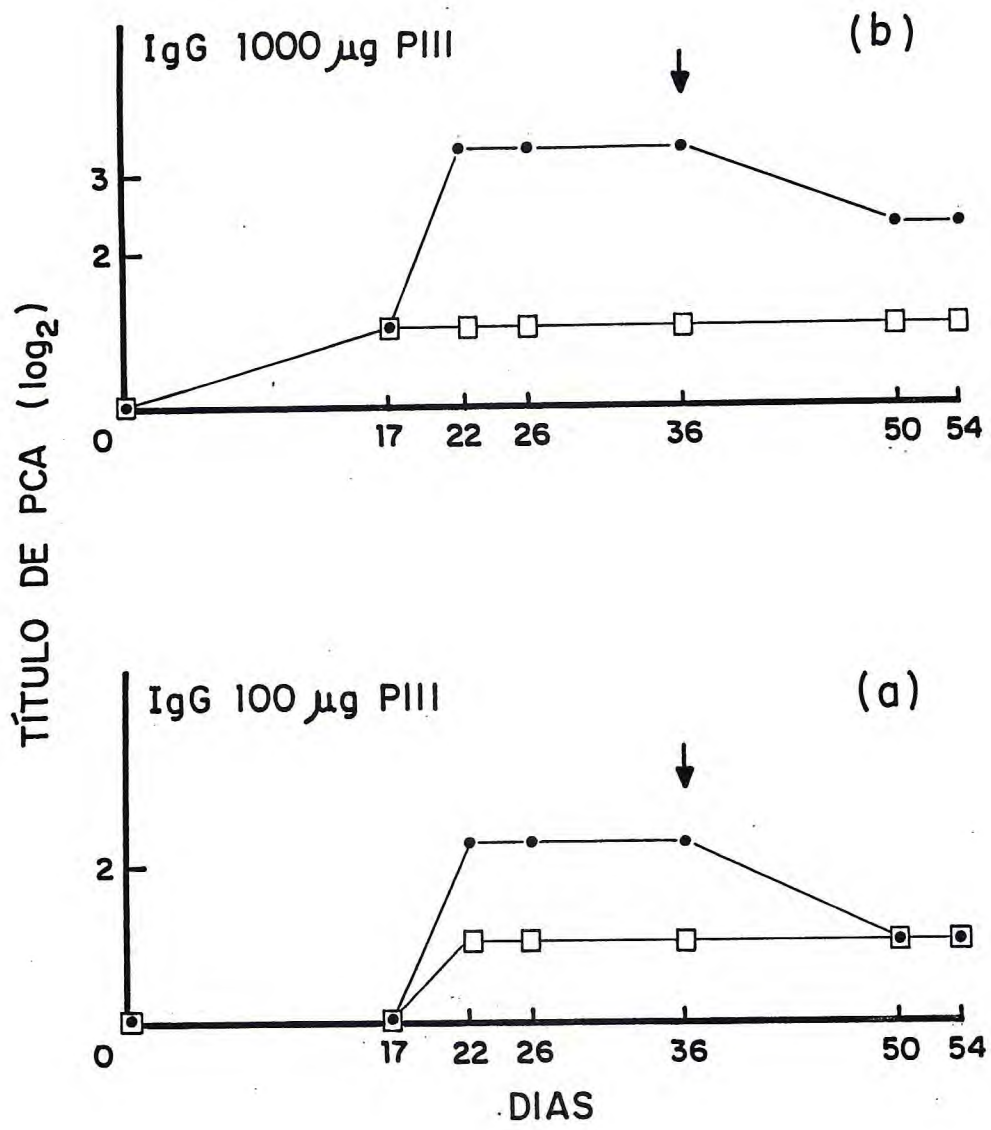
Estes dados revelam títulos de PCA mais elevados na resposta primária para o antígeno específico da imunização, uma vez que o E.T. contém cerca de 10% de PIII. Note-se que o reforço não foi eficaz para elevar ou manter os títulos de PCA obtidos em primária, para a resposta específica.

FIGURA 13 - Resposta do tipo IgG em camundongos alimentados com 10 doses de PIII (*Dioclea grandiflora* Mart.):

a) 100 μ g

b) 1000 μ g

PCA desencadeada em camundongos com 2 horas de latência, após a injeção intradérmica das diferentes diluições dos soros, com 250 μ g de E.T. (\square — \square) e 250 μ g de PIII (\bullet — \bullet). A seta na figura indica o início do reforço.



4.4.2.4 - Lectina 1000 μg

Os resultados obtidos pela alimentação de camundongos com 1000 μg de lectina (PIII) para a resposta do tipo IgG, são mostrados na FIGURA 13 b. Quando a PCA para estes soros foi desencadeada com o antígeno específico (PIII), foi revelado um título no valor de 1 com 17 dias (5 dias após a décima dose da alimentação), elevando-se a 3,3 com 22 dias (10 dias após a décima dose da alimentação), mantendo-se inalterado até o 36º dia (24 dias após a décima dose da alimentação). Nos dias 50 e 54 (3 e 7 dias após a décima dose do reforço, respectivamente) foram revelados títulos no valor de 2,3. Títulos de PCA para a resposta do tipo IgG anti E.T. para estes soros, foram revelados com 17 dias (5 dias após a décima dose da alimentação) no valor de 1 e mantiveram-se inalterados durante toda a experiência.

Estes resultados mostram que títulos mais elevados são obtidos com PCAs desencadeadas com o antígeno específico e que doses mais elevadas do antígeno sensibilizante (1000 μg) revelam uma melhor resposta. Note-se que o reforço não foi eficaz para elevar ou manter os títulos de PCA obtidos em primária, para a resposta específica (PIII).

4.4.3 - Extrato total sem lectina

4.4.3.1 - Extrato total sem lectina 100 μg

Os resultados das PCAs para a resposta do tipo IgG em camundongos alimentados com 10 doses de 100 μg de E.T.-PIII, foram negativos.

4.4.3.2 - Extrato total sem lectina 1000 μ g

Os camundongos alimentados com 10 doses diárias de 1000 μ g de E.T.-PIII também apresentaram resultados negativos, para as determinações dos títulos de PCA para a resposta do tipo IgG.

4.5 - Resposta do Tipo IgE em Camundongos Alimentados com 10 Doses de Frações Protéicas de *Dioclea grandiflora* Mart.

4.5.1 - Extrato total

4.5.1.1 - Extrato total 100 μ g

Os resultados obtidos pela alimentação de camundongos com 100 μ g de extrato total (E.T.) para a resposta do tipo IgE, são mostrados na FIGURA 14 a. Quando a PCA para estes soros foi desencadeada com o antígeno específico E.T., foi detectado no 22º dia (10 dias após a décima dose da alimentação) um título de 2,3, que caiu rapidamente e reapareceu com 50 dias (3 dias após a décima dose do reforço) com um título de 2,3, desaparecendo com 54 dias (7 dias após a décima dose do reforço). Não foram revelados títulos de PCA para a resposta do tipo IgE anti-PIII.

Estes dados mostram que baixos títulos de PCA foram revelados apenas com o antígeno específico da imunização.

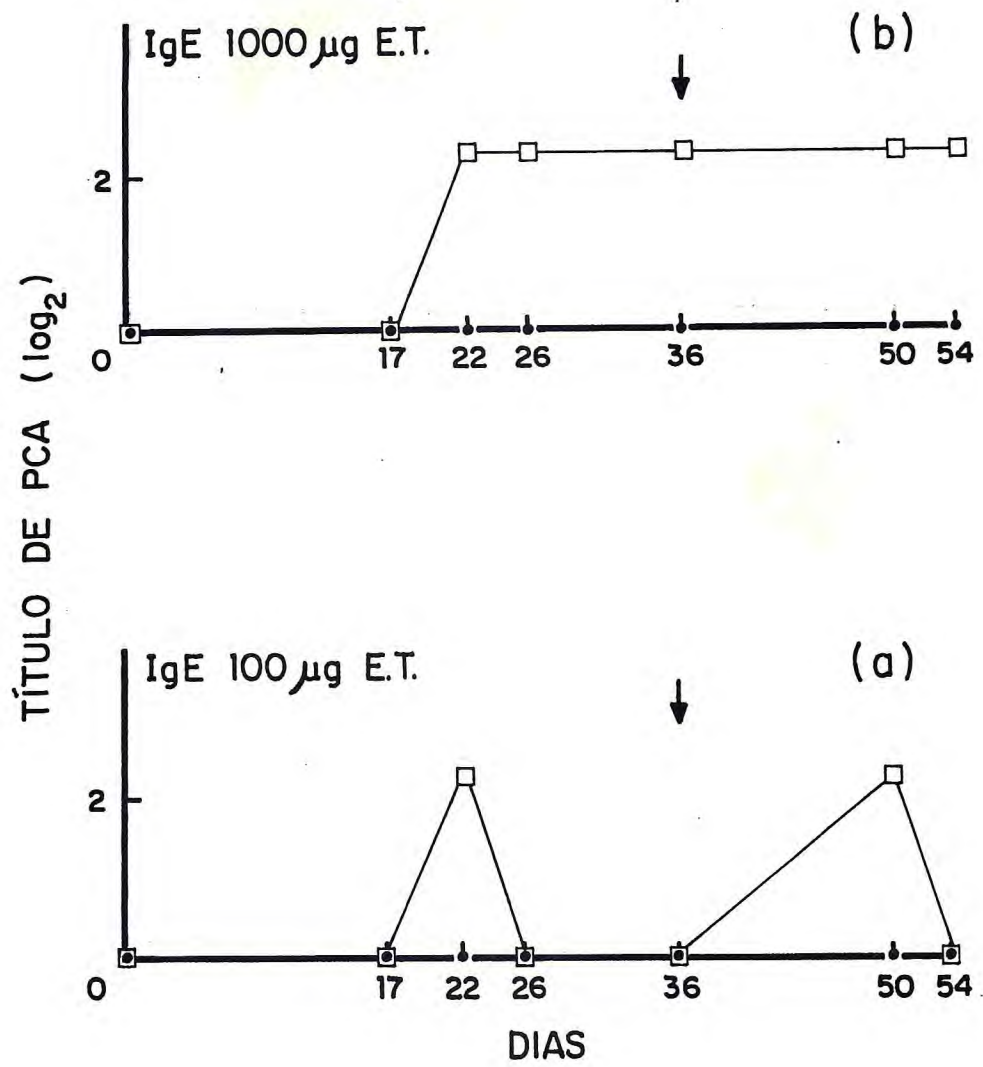
4.5.1.2 - Extrato total 1000 μ g

FIGURA 14 - Resposta do tipo IgE em camundongos alimentados com 10 doses de E.T. (*Dioclea grandiflora* Mart.):

a) 100 μ g

b) 1000 μ g

PCA desencadeada em ratos com 18 horas de latência, após a injeção intradérmica das diferentes diluições dos soros, com 1,0 mg de E.T. (\square — \square) e 1,0 mg de PIII (\bullet — \bullet). A seta da figura indica o início do reforço.



Os resultados obtidos pela alimentação de camundongos com 1000 μg de extrato total (E.T.) para a resposta do tipo IgE, são mostrados na FIGURA 14 b. Quando a PCA para estes soros foi desencadeada com o antígeno específico da alimentação (E.T.), títulos de PCA foram revelados a partir do 22º dia (10 dias após a décima dose da alimentação) com valor de 2,3, que se manteve inalterado durante a resposta primária e na resposta secundária. Não foram revelados títulos de PCA para a resposta do tipo IgE anti-PIII.

Estes dados mostram que baixos títulos de PCA foram revelados apenas com o antígeno específico, mas que diferentes dos de animais alimentados com 100 μg de E.T., mantiveram-se inalterados durante toda a experiência.

4.5.2 - Lectina

4.5.2.1 - Lectina 1 μg

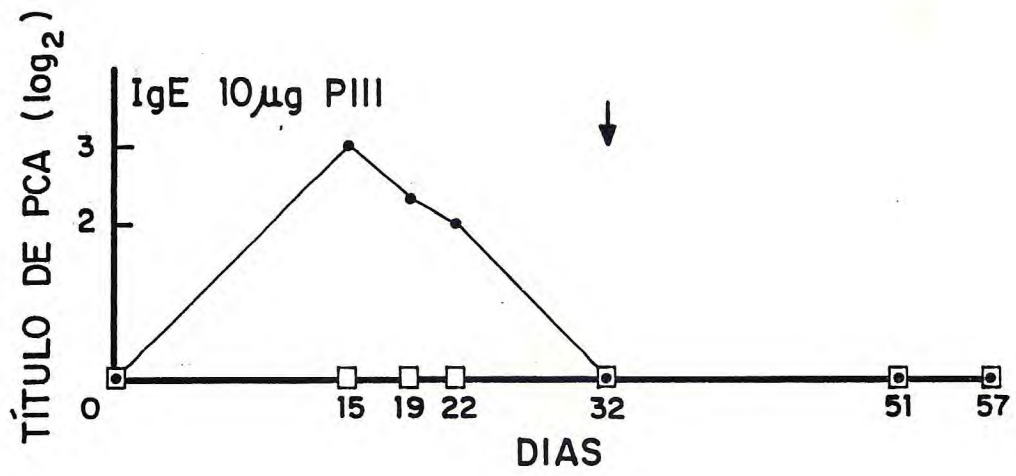
Os resultados das PCAs para a resposta do tipo IgE com soros de camundongos alimentados com 10 doses de 1 μg de lectina, foram negativos como também o foram para IgG.

4.5.2.2 - Lectina 10 μg

Os resultados obtidos pela alimentação de camundongos com 10 μg de lectina (PIII) para a resposta do tipo IgE, são mostrados na FIGURA 15. Para a PCA destes soros desencadeada com o antígeno específico da alimentação (PIII), foram detectados já no 15º dia (3 dias após a décima dose da alimentação) um título no valor de 3, que foi diminuindo e desapareceu com 32 dias (20 dias após a décima

FIGURA 15 - Resposta do tipo IgE em camundongos alimentados com 10 doses de 10 μ g de PIII (*Dioclea grandiflora* Mart.).

PCA desencadeada em ratos com 18 horas de latência, após a injeção intradérmica das diferentes diluições dos soros, com 1,0 mg de E.T. (\square — \square) e 1,5 mg de PIII (\bullet — \bullet). A seta da figura indica o início do reforço.



dose da alimentação). Não foram revelados títulos de PCA para a resposta do tipo IgE anti-E.T.

Estes dados revelam títulos de PCA desencadeados com o antígeno específico (1,5 mg de PIII), enquanto que PCA desencadeada com E.T. (1,0 mg de E.T.) não continha antígeno suficiente para revelar resposta específica. Estes dados revelam ainda que, o reforço não foi eficaz para induzir o reaparecimento de títulos de PCA anti-PIII.

4.5.2.3 - Lectina 100 μ g

Não foram revelados títulos de PCA para a resposta do tipo IgE anti-PIII com soros de camundongos alimentados com 10 doses de 100 μ g de lectina (PIII).

4.5.2.4 - Lectina 1000 μ g

Não foram revelados títulos de PCA para a resposta do tipo IgE anti-PIII com soros de camundongos alimentados com 10 doses de 1000 μ g de PIII.

4.5.3 - Extrato total sem lectina

4.5.3.1 - Extrato total sem lectina 100 μ g

Não foram revelados títulos de PCA para a resposta do tipo IgE com soros de camundongos alimentados com 10 doses de 100 μ g de E.T.-PIII, como também o foram para IgG.

4.5.3.2 - Extrato total sem lectina 1000 μ g

Não foram revelados títulos de PCA para a resposta do tipo IgE com soros de camundongos alimentados com 10 doses de 1000 μ g de E.T.-PIII, como também o foram para IgG.

4.6 - Resposta do Tipo IgG em Camundongos Alimentados com Dose Única de Frações Protéicas com Posterior Imunização por Via Subcutânea com os Mesmos Antígenos, Extraídos de *Dioclea grandiflora* Mart.

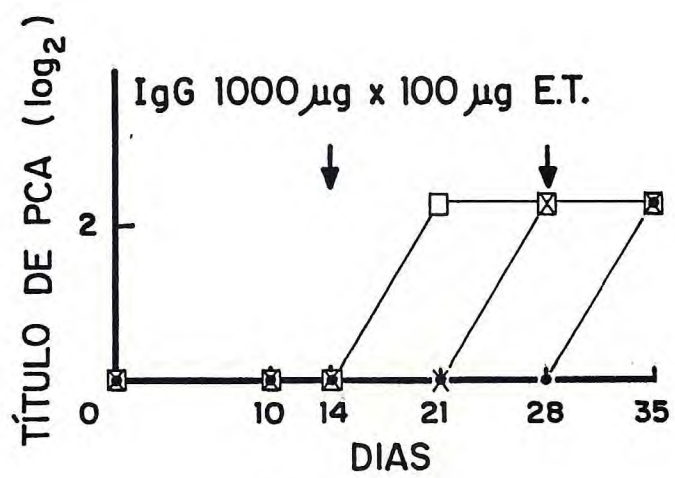
4.6.1 - Extrato total

Os resultados obtidos pela alimentação de camundongos com 1000 μ g de extrato total (E.T.), dose única, com posterior imunização por via subcutânea com 100 μ g de extrato total (E.T.) para a resposta do tipo IgG, são mostrados na FIGURA 16. Não foram detectados títulos de PCA para a resposta do tipo IgG com 10 e 14 dias após a dose única de E.T. por via oral, quando as PCAs foram desencadeadas com E.T., PIII e E.T.-PIII. No 21º dia (7 dias após a imunização subcutânea) foi revelado um título de 2,3 para a PCA desencadeada com E.T., que se manteve inalterado após o reforço, com 35 dias após a imunização inicial por via oral. Quando a PCA para estes soros foi desencadeada com PIII, um título de 2,3 foi revelado no 35º dia (7 dias após o reforço). Quando a PCA para estes mesmos soros foi desencadeada com E.T.-PIII, um título de 2,3 foi revelado com 28 dias, que se manteve inalterado com 35 dias (7 dias após o reforço).

Estes dados mostram que a resposta específica é revelada mais cedo e no decurso da experiência os títulos

FIGURA 16 - Resposta do tipo IgG em camundongos alimentados com dose única de 1,0 mg de E.T. com posterior imunização por via subcutânea com 100 µg de E.T. (*Dioclea grandiflora* Mart.).

PCA desencadeada em camundongos com 2 horas de latência, após a injeção intradérmica das diferentes diluições dos soros, com 250 µg de E.T. (□—□), 250 µg de E.T.-PIII (X—X), 250 µg de PIII (●—●). As setas da figura indicam os dias da imunização subcutânea.



revelados são baixos. A resposta anti-PIII é a que se revela mais tardiamente uma vez que contém cerca de 10% do antígeno sensibilizante.

4.6.2 - Lectina

Os resultados obtidos pela alimentação de camundongos com 1000 μg de lectina (PIII), dose única, com posterior imunização por via subcutânea com 100 μg de lectina para a resposta do tipo IgG, são mostrados na FIGURA 17. Não foram detectados títulos de PCA para a resposta do tipo IgG com 10 e 14 dias após a dose única de PIII por via oral, quando as PCAs foram desencadeadas com E.T., PIII e E.T.-PIII. No 21º dia (7 dias após a imunização por via subcutânea), contados da data da alimentação por via oral, foram revelados títulos de 2,3 para a resposta do tipo IgG anti-E.T. e anti-PIII, que se mantiveram inalterados com 28 dias, bem como com 35 dias (7 dias após o reforço). Não foram revelados títulos de PCA para a resposta do tipo IgG anti-E.T.-PIII, como era de se esperar.

Estes dados mostram uma baixa sensibilização da lectina (100 μg de PIII) além de revelar uma mesma resposta para os antígenos desencadeantes E.T. e PIII.

4.6.3 - Extrato total sem lectina

Os resultados obtidos pela alimentação de camundongos com 1000 μg de extrato total sem lectina (E.T.-PIII), dose única, com posterior imunização por via subcutânea com 100 μg de extrato total sem lectina para a resposta do tipo IgG, são mostrados na FIGURA 18. Não foram detectados títulos de PCA para a resposta do tipo IgG com 10 e 14 dias após

FIGURA 17 - Resposta do tipo IgG em camundongos alimentados com dose única de 1,0 mg de PIII com posterior imunização por via subcutânea com 100 μ g de PIII (*Dioclea grandiflora* Mart.).

PCA desencadeada em camundongos com 2 horas de latência, após a injeção intradérmica das diferentes diluições dos soros, com 250 μ g de E.T. (\square — \square), 250 μ g de E.T.-PIII (X—X) e 250 μ g de PIII (\bullet — \bullet). As setas da figura indicam os dias da imunização subcutânea.

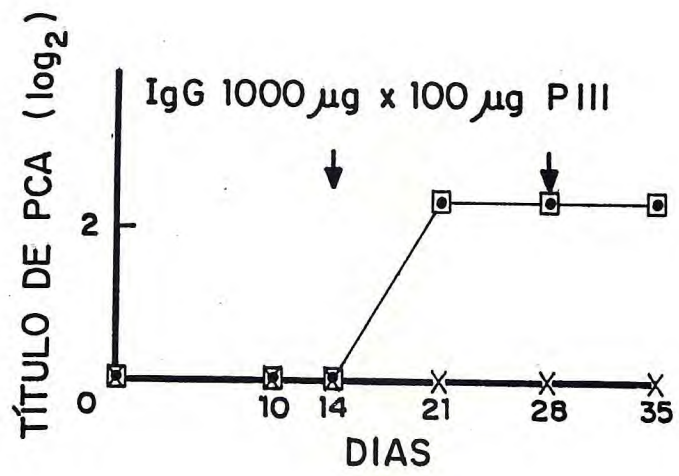
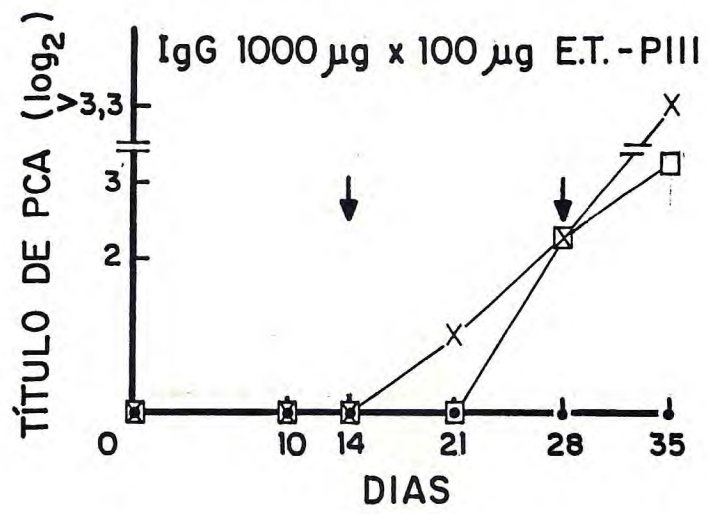


FIGURA 18 - Resposta do tipo IgG em camundongos alimentados com dose única de 1,0 mg de E.T.-PIII com posterior imunização por via subcutânea com 100 μ g de E.T.-PIII (*Dioclea grandiflora* Mart.).

PCA desencadeada em camundongos com 2 horas de latência, após a injeção intradérmica das diferentes diluições dos soros, com 250 μ g de E.T. (\square — \square), 250 μ g de E.T.-PIII (X—X) e 250 μ g de PIII (\bullet — \bullet). As setas da figura indicam os dias da imunização subcutânea.



a dose oral única de extrato total sem lectina (E.T.-PIII), quando as PCAs foram desencadeadas com E.T., PIII e E.T.-PIII. No 21º dia (7 dias após a imunização subcutânea), contados da data da alimentação por via oral, foi detectado um título no valor de 1 para a resposta do tipo IgG anti-E.T.-PIII e com 28 dias um título de 2,3 foi revelado e atingindo valores maiores que 3,3 com 35 dias (7 dias após o reforço), para PCA desencadeada com o antígeno específico (E.T.-PIII). Para a PCA desencadeada com E.T. um título de 2,3 foi revelado com 28 dias (14 dias após a imunização por via subcutânea), elevando-se a 3,3 com 35 dias (7 dias após o reforço). Para estes mesmos soros não foram revelados títulos de PCA para a resposta do tipo IgG anti-PIII, como era de se esperar.

Estes dados mostram uma melhor resposta para o antígeno específico da imunização. A resposta anti-E.T. revela uma pequena diferença com relação a resposta do antígeno específico, anti-E.T.-PIII, que é atribuída por conter cerca de 10% a menos da concentração do antígeno imunizante. Para o caso da resposta anti-PIII o mesmo não estava presente na imunização.

4.7 - Resposta do Tipo IgE em Camundongos Alimentados com Dose Única de Frações Protéicas com Posterior Imunização por Via Subcutânea com os Mesmos Antígenos, Extraídos de *Dioeclea grandiflora* Mart.

4.7.1 - Extrato total

Não foram revelados títulos de PCA para a resposta do tipo IgE com soros de camundongos alimentados com 1000 µg de extrato total (E.T.), dose única, com posterior imunização por via subcutânea com 100 µg de extrato total.

4.7.2 - Lectina

Não foram revelados títulos de PCA para a resposta do tipo IgE com soros de camundongos alimentados com 1000 µg de lectina (PIII), dose única, com posterior imunização por via subcutânea com 100 µg de lectina.

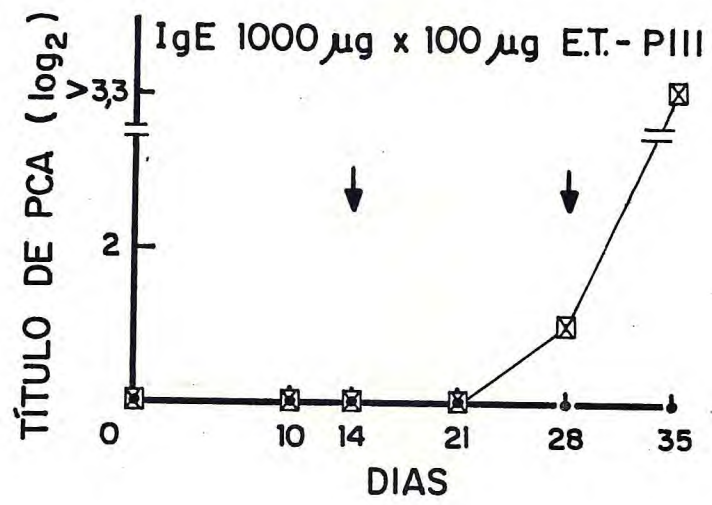
4.7.3 - Extrato total sem lectina

Os resultados obtidos pela alimentação de camundongos com 1000 µg de extrato total sem lectina (E.T.-PIII), dose única, com posterior imunização por via subcutânea com 100 µg de extrato total sem lectina para a resposta do tipo IgE, são mostrados na FIGURA 19. Não foram detectados títulos de PCA para a resposta do tipo IgE com 10 e 14 dias após a dose oral única de E.T.-PIII, quando as PCAs foram desencadeadas com E.T., PIII e E.T.-PIII. Não foram detectados títulos de PCA para a resposta do tipo IgE com 21 dias (7 dias após a imunização por via subcutânea), porém com 28 dias (14 dias após a imunização por via subcutânea) foi revelado um título de 1 para os antígenos desencadeantes E.T. e E.T.-PIII. Com 35 dias (7 dias após o reforço) foi revelado um título com valor acima de 3,3, para a resposta do tipo IgE anti-E.T. e anti-E.T.-PIII. Não foram revelados títulos com PCA desencadeada com PIII.

Estes dados revelam uma mesma resposta para os antígenos desencadeantes E.T. e E.T.-PIII, apesar de E.T. conter cerca de 10% a menos da concentração do antígeno sensibilizante, E.T.-PIII. A resposta anti-PIII negativa é explicada pelo fato da não existência de PIII na imunização.

FIGURA 19 - Resposta do tipo IgE em camundongos alimentados com dose única de 1,0 mg de E.T.-PIII com posterior imunização por via subcutânea com 100 µg de E.T.-PIII (*Dioclea grandiflora* Mart.).

PCA desencadeada em ratos com 18 horas de latência, após a injeção intradérmica das diferentes diluições dos soros, com 1,0 mg de E.T. (□—□), 1,0 mg de E.T.-PIII (X—X) e 1,0 mg de PIII (●—●). As setas da figura indicam os dias da imunização subcutânea.



5 - DISCUSSÃO

5.1 - Resposta do Tipo IgG em Camundongos Imunizados por Via Subcutânea com Frações Protéicas de *Dioctlea grandiflora* Mart.

Os títulos de PCA que quantificam a síntese de IgG em camundongos imunizados por via subcutânea com diferentes doses de E.T. (FIGURA 6), PIII (FIGURA 7) e E.T.-PIII (FIGURA 8) revelam que o perfil desta síntese é comparável ao da síntese de IgG, quando se usa antígenos como a ovalbumina (FIGURA 5a). Isto quer dizer que em baixas doses de antígeno os títulos de PCA são baixos e aumentam com as doses de reforços (PROUVOST-DANON et al., 1972). Embora tenha havido uma concordância no perfil da síntese de IgG entre ovalbumina e as três frações protéicas de *Dioctlea grandiflora* Mart., E.T., PIII e E.T.-PIII (FIGURAS 6, 7 e 8, respectivamente), os títulos de PCA são bem mais baixos do que os obtidos quando os camundongos foram imunizados com ovalbumina (FIGURA 5a). Além disso, os títulos de IgG anti-PIII foram mais baixos, quando comparados aos de IgG anti-E.T. e IgG anti-E.T.-PIII. Estes baixos títulos sugerem capacidade imunogênica dos antígenos de *D. grandiflora* Mart. mais baixa do que a de antígenos como ovalbumina. Além disso, as lectinas não agem apenas como uma proteína dotada de capacidade imunogênica, elas agem também como mitógenos. A lectina de *D. grandiflora* Mart. já foi caracterizada como um mitógeno do tipo T (PROUVOUST-DANON, 1984). Outra peculiaridade da lectina de *D. grandiflora* Mart. em relação à síntese de IgG é que a resposta específica, revelada em animais imunizados com E.T., foi tardia quando comparada a resposta aos demais

antígenos do extrato total (FIGURA 6). Por outro lado, a resposta aos demais antígenos do E.T. foi mais precoce na ausência de PIII (FIGURA 8). Estes fatos mostram claramente o efeito modulador da lectina sobre a indução da síntese de IgG.

5.2 - Resposta do Tipo IgE em Camundongos Imunizados por Via Subcutânea com Frações Protéicas de *Dioclea grandiflora* Mart.

Os títulos de PCA que quantificam a síntese de IgE em camundongos imunizados com diferentes doses de E.T. (FIGURA 9), PIII (FIGURA 10) e E.T.-PIII (FIGURA 11), por via subcutânea, mostram que apenas no caso da IgE específica anti-PIII o perfil de síntese é comparável ao da síntese de IgE anti-ovalbumina, considerando que a resposta do tipo IgE é mais intensa quando as doses do antígeno sensibilizante são mais baixas (PROUVOST-DANON et al., 1972). A resposta do tipo IgE induzida por E.T. e E.T.-PIII aumentou seguindo o aumento da dose do agente imunizante. Acredita-se que isto se deva ao fato de que, nos dois casos referidos, trata-se de uma mistura de proteínas. Os títulos de PCA induzidos pelos antígenos de *D. grandiflora* Mart. são baixos, como são igualmente baixos os títulos de IgE anti-ovalbumina revelados nos camundongos utilizados no presente trabalho. Mais uma vez, pode-se dizer que a capacidade imunogênica dos antígenos de *Dioclea grandiflora* Mart. é diferente da de antígeno como ovalbumina, e além disso, possivelmente estamos diante de fatores genéticos, que são conhecidos por exercerem profunda influência na síntese de IgE (PROUVOST-DANON et al., 1977). Como na síntese de IgG anti-PIII (FIGURA 6d), a IgE anti-PIII revelada durante a imunização com E.T. (FIGURA 9) apareceu tardiamente em relação a IgE indu

zida pelos demais antígenos vegetais. Contudo, a presença de lectina parece favorecer a resposta mais precoce do tipo IgE anti-E.T.-PIII (FIGURA 9d), quando comparada a resposta do agente imunizante não contendo lectina (FIGURA 11d). Estes resultados revelam a ação moduladora da lectina também na cinética da síntese de IgE e revelam ainda uma modulação oposta à exercida na síntese de IgG. Este fato vem corroborar as idéias de "antagonismo" entre IgG e IgE (JARRETT, 1984), nos mecanismos do sistema imuno-regulador.

5.3 - Resposta do Tipo IgG em Camundongos Alimentados com 10 Doses das Frações Proteicas de *Dioclea grandiflora* Mart.

Os títulos de PCA que quantificam a síntese de IgG em camundongos alimentados com diferentes doses de E.T. (FIGURA 12), PIII (FIGURA 13) e E.T.-PIII revelam que quando os antígenos eram E.T. e PIII tais títulos aumentavam no decorrer do período de imunização, e quando o antígeno era E.T.-PIII não foram revelados títulos de PCA, para a resposta do tipo IgG específica. Na imunização com E.T. e PIII, doses mais altas dos antígenos contendo lectina revelam títulos de PCA mais elevados e potenciados (FIGURA 12), embora os títulos de PCA para IgG anti-PIII específica não tenham sido potenciados (FIGURA 13), revelando-se mais baixos do que em primária. Por outro lado, títulos de IgG anti-PIII de camundongos alimentados com E.T. revelam-se tardiamente em relação às outras proteínas contidas no E.T. e mostram um perfil de síntese semelhante à IgG anti-E.T., em camundongos alimentados com doses mais baixas (FIGURA 12 a). Estes resultados demonstram que a lectina (PIII) de *Dioclea grandiflora* Mart. quando ministrada por via oral favorece a resposta imunológica específica do tipo IgG, o que pode

ser atribuída ao caráter imunomodulador da lectina, como já foi visto com a Con A (JANOSSY & GREAVES, 1971) e a PHA (ASTORQUIZA & SAYAGO, 1984).

5.4 - Resposta do Tipo IgE em Camundongos Alimentados com 10 Doses das Frações Protéicas de *Dioclea grandiflora* Mart.

Os títulos de PCA que quantificam a síntese de IgE em camundongos alimentados com diferentes doses de E.T. (FIGURA 14), PIII (FIGURA 15) e E.T.-PIII, revelam uma síntese de IgE específica para E.T. e PIII, não acontecendo o mesmo para E.T.-PIII. Para os camundongos alimentados com 10 doses de E.T., a resposta do tipo IgE mostrou-se mais elevada, atingindo posteriormente um "plateau" com doses mais altas (FIGURA 14 b), embora os títulos fossem muito baixos. Além disso, a resposta específica para IgE anti-PIII (FIGURA 15) mostrou-se baixa e transitória em primária, não foi revelada em secundária e só foi detectada em camundongos alimentados com 10 μ g de PIII. Isto demonstra a existência de uma concentração ótima de lectina, capaz de induzir a síntese de IgE por via oral. Estes resultados revelam, como no caso da síntese de IgG, que a presença de lectina favorece a síntese de IgE.

5.5 - Resposta do Tipo IgG em Camundongos Alimentados com Dose Única das Frações Protéicas de *Dioclea grandiflora* Mart. com Posterior Imunização por Via Subcutânea com os Mesmos Antígenos

No caso da resposta específica do tipo IgG, não foram revelados títulos de PCA em camundongos alimentados com

dose única de E.T., E.T.-PIII e PIII de *Dioclea grandiflora* Mart.. Os títulos de PCA revelados para a síntese de IgG anti-E.T. (FIGURA 16), IgG anti-PIII (FIGURA 17) e IgG anti-E.T.-PIII (FIGURA 18) de camundongos alimentados com dose única do antígeno específico, com posterior imunização subcutânea com este mesmo antígeno mostraram, à primeira vista, que os camundongos alimentados com E.T. (FIGURA 16) e com PIII (FIGURA 17) tinham títulos de PCA mais baixos do que quando revelados sem alimentação prévia (FIGURAS 6 e 7). Por outro lado, os camundongos alimentados com dose única de E.T.-PIII (FIGURA 18) apresentaram títulos de PCA para a resposta do tipo IgG comparáveis aos não alimentados previamente, com o antígeno específico (FIGURA 8). Além disso, a resposta do tipo IgG em camundongos que receberam tratamento prévio com lectina em diferentes concentrações (FIGURAS 16 e 17) foi revelada mais precocemente. Estes dados falam em favor de uma modulação da resposta imunológica pela lectina, que não parece estar ligada à concentração da mesma, como já havia sido mostrado por ASTORQUIZA & SAYAGO (1984), em camundongos imunizados por via intraperitoneal com PHA.

5.6 - Resposta do Tipo IgE em Camundongos Alimentados com Dose Única das Frações Protéicas de *Dioclea grandiflora* Mart. com Posterior Imunização por Via Subcutânea com os Mesmos Antígenos

No caso da resposta específica do tipo IgE, não foram revelados títulos de PCA em camundongos alimentados com dose única de E.T., E.T.-PIII e PIII de *Dioclea grandiflora* Mart.. Não foram revelados títulos de PCA para a síntese de IgE específica em camundongos alimentados com dose única do antígeno contendo lectina (E.T. e PIII), com posterior imu-

nização subcutânea com este mesmo antígeno, a síntese de IgE induzida por via subcutânea foi suprimida. Para os camundongos alimentados com dose única de E.T.-PIII (FIGURA 19), com posterior imunização subcutânea com este mesmo antígeno, a resposta do tipo IgE mostrou uma cinética semelhante àquela induzida pela imunização subcutânea com E.T.-PIII (FIGURA 11 d). Estes fatos demonstram mais uma vez o efeito modulador da lectina sobre a resposta imunológica, expressa pelo seu caráter mitogênico. Trabalho anterior (RESTUM-MIGUEL & PROUVOST-DANON, 1985) mostrou potenciação da resposta do tipo IgE na imunização subcutânea em camundongos previamente alimentados com doses múltiplas da fração albumínica, contendo lectina, de *Artocarpus integrifolia*. No presente trabalho, o pretratamento foi, porém, feito com dose única do suposto antígeno. Neste caso, a supressão seria comparável à observada por HANSON et al. (1977) que encontraram supressão da síntese de IgE, em camundongos previamente alimentados com 20 mg de ovalbumina.

6 - CONCLUSÕES

- 1 - A síntese de IgG específica dos antígenos E.T., E.T.-PIII e PIII na imunização subcutânea obedece ao perfil clássico da síntese de IgG, induzida por outros antígenos como ovalbumina, embora os títulos de PCA tenham sido mais baixos.
- 2 - Os títulos de PCA específicos para a síntese de IgG anti-PIII são mais baixos do que os revelados para os demais antígenos de *Dioclea grandiflora* Mart., e a lectina modula a cinética da síntese de IgG.
- 3 - Da síntese de IgE específica dos antígenos PIII, E.T., E.T.-PIII na imunização subcutânea, somente a específica de PIII obedeceu ao perfil clássico de maiores títulos de PCA induzidos por baixas doses de antígeno. A síntese de IgE anti-E.T.-PIII foi mais elevada em resposta a doses crescentes destes antígenos.
- 4 - A síntese de IgG específica induzida por imunização subcutânea pela fração protéica contendo lectina é retardada, quando comparada à síntese induzida por fração protéica sem lectina. Já a síntese de IgE em idênticas condições, é antecipada.
- 5 - O extrato total e a lectina de *Dioclea grandiflora* Mart., quando ministradas por via oral em doses repetidas, induzem a síntese de IgG e IgE específicas, o que não foi revelado para a fração protéica sem lectina.
- 6 - Doses elevadas de lectina de *Dioclea grandiflora* Mart., ministradas gradualmente por via oral, induzem a síntese

se de IgG e não de IgE, enquanto que doses baixas de lectina (PIII) induzem a síntese de IgE específica, mas são incapazes de induzir a síntese de IgG.

- 7 - Dose única de E.T., PIII e E.T.-PIII de *Dioclea grandiflora* Mart., ministrada por via oral, não induz a síntese de imunoglobulinas do tipo IgG e IgE.
- 8 - Dose única de E.T. e PIII, ministrada por via oral, antecipa, mas não potencia a síntese de IgG específica induzida por imunização subcutânea com os mesmos antígenos. Em condições semelhantes, a resposta do tipo IgE é suprimida. Já o tratamento prévio com dose única de E.T.-PIII, não revela síntese de IgG específica, enquanto a IgE é detectada.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRÉ, C., J.F.HEREMANS, J.P.VAERMAN & C.L. CAMBIASO. A mechanism for the induction of immunological tolerance by antigen feeding: antigen - antibody complexes. *J.Exp. Med.* **142**,1509-1519, 1975.
- ANDRÉ, C., R.LAMBERT, H.BAZIN & J.F.HEREMANS. Interference of oral immunization with the intestinal absorption of heterologous albumin. *Eur. J. Immunol.* **4**, 701-704, 1974.
- ASTORQUIZA, M.I. & S.SAYAGO. Modulation of IgE response by phytohemagglutinin. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* **73**, 367-369, 1984.
- BARRATT, M.E.J., P.J.STRACHAN & P. PORTER. Immunologically mediated nutritional disturbances associated with soya protein antigens. *Proc. Nutr. Soc.* **38**, 143-150, 1979.
- BAZIN, H. & B. PLATTEAU. Production of circulating reaginic (IgE) antibodies by oral administration of ovalbumin to rats. *Immunology* **30**, 679-684, 1976.
- BESREDKA, A. Local immunization. Williams & Wilkins, Baltimore, 181 pp., 1927.
- BINAGHI, R.A. & A. PERRUDET-BADOUX. Activité additive des anticorps IgE et IgGa dans la reaction anaphylactique (PCA) chez le rat. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)* **127** C, 49-56, 1977.
- BIOZZI, G., M.SIQUEIRA, D.MOUTON, O.A. SANT'ANNA, C.STIFFELL, M.B.ESTEVES & Y.BOUTHILLIER. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)* **128** C,393, 1977. Citado por PROUVOST-DANON et al., 1977.

- BYARS, N.E. & R.W.FERRARESI. Intestinal anaphylaxis in the rat as a model of food allergy. *Clin. Exp. Immunol.* **24**, 352-356, 1976.
- CAUSSE, H. & P.ROUGE. Lectin release from imbibed soybean seed and its possible function. In *Lectins. Biol. Biochem. Clin. Biochem.*, T.C. Hansen, G.A. Spengler, ed., **3**, 559-572, Berlin/New York: DeGruyter, 1983.
- CHASE, M.W. Inhibitions of experimental drug allergy by prior feeding of the sensitizing agent. *Proc. Soc. Exp. Biol.* **61**, 257, 1946.
- CRABBÉ, P.A., D.R.HASH, H.BAZIN, H.EYSSEN & J.F. HEREMANS. Antibodies of the IgA type in intestinal plasma cells of germ free mice after oral or parenteral immunization with ferritin. *J. Exp. Med.* **130**, 723, 1969.
- DAËRON. M., A.PROUVOST-DANON & A.G.VOISIN. Mast cell membrane antigens and Fc receptors in anaphylaxis. II. Functionally distinct receptors for IgG and for IgE on mouse mast cells. *Celular Immunology* **49**, 178-189, 1980.
- DAVID, M.F. Prevention of homocytotropic antibody formation and anaphylaxis in rats by prefeeding antigen. Abstract. *J. Allergy Clin. Immunol.* **55**, 135, 1975.
- DETERMAN, H. *Gel chromatography*. Springer - Verlag. 2nd., New York, 202 pp. 1969.
- DIXON, H.B.F. Defining a lectin. *Nature* **292**, 192, 1981.
- EHRlich, P. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **17**, 1218, 1891. Citado por ROTHBERG et al., 1973.
- ENGELFRIED, J.J. *J. Allergy* **11**, 569, 1940. Citado por PERLMAN, 1980.

- ETZLER, M.E. Plant lectins: Molecular and biological aspects. A review. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **36**, 209-234, 1985.
- FOREMAN, J. Receptor - Secretion coupling in mast cells. *Trends Pharmacol. Sci.* 460-462, 1980.
- GELL, P.G.H. & R.R.A.COOMBS. *Clinical aspects of immunology.* Blackwell Scient. Publ. **1**, Oxford, 1968.
- GOLDSTEIN, I., R.C.HUGHES, M.MONSIGNY, T.OSAWA & N. SHARON. What should be called a lectin? *Nature* **285** (5760), 66, 1980.
- HANSON, D.G., N.M.VAZ, L.C.S.Maia, M.M.HORNBOOK, J.M. LYNCH & C.A.ROY. Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* **55**, 526-532, 1977.
- HANSON, D.G., N.M.VAZ, L.A.RAWLINGS & J.M.LYNCH. Inhibition of specific immune responses by feeding protein antigens. II. Effects of prior passive and active immunization. *J. of Immunology* **122** (6), 2261-2266, 1979.
- HOLT, P.G., J.E.BATTY & K.J.TURNER. Inhibition of specific IgE responses in mice by pre-exposure to inhaled antigen. *Immunology* **42**, 409-417, 1981.
- HONAVAR, P.M., C.V.SHIH & I.E.LIENER. *J. Nutr.* **77**, 109-114, 1962. Citado por GATEHOUSE, A.M.R. Antinutritional proteins in plants, 1984. Enviado para publicação.
- HOOK, W.A., S.F.DOUGHERTY & J.J.OPPENHEIM. Release of histamine from hamster mast cells by concanavalin A and phytohemagglutinin. *Infection and Immunity* **9** (5), 903-908, 1974.

- HORTA-BARROS, A.C. *Isolamento e caracterização parcial da lectina de Dioclea grandiflora Mart.* Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 1982.
- JAFFÉ, W.C. Toxicity of raw kidney beans. *Experientia* **5**, 81-84, 1949. Citado por JAFFÉ, 1969.
- JAFFÉ, W.C. Hemagglutinins. In *Toxic constituents of plant foodstuffs*. I.E.LIENER, ed., Academic Press, New York, 1969.
- JAFFÉ, W.C. & M.E.FLORES. *Arch. Latinoam. Nutr.*, **25**, 79-90, 1975. Citado por GATEHOUSE, A.M.R. Antinutritional proteins in plants, 1984. Enviado para publicação.
- JAFFÉ, W.G. & M.J.GOMEZ. Beans of high or low toxicity. *Qual. Plant. - Pl. Fds. hum. Nutr.* XXIV 3/4, 359-365, 1975.
- JANOSSY, G. & M.F. GREAVES. Lymphocyte activation. I. Response of T and B lymphocyte to phytomitogens. *Clin. Exp. Immunol.* **9**, 483-498, 1971.
- JARRETT, E.E.E. Perinatal influences on IgE responses. *Lancet* Outubro, **6**, 797-799, 1984.
- KATZ, D.H., T.HAMAOKA, P.E.NEWBURGER & B.BENACERRAF. Hapten specific IgE antibody responses in mice. IV. Evidence for distinctive sensitivities of IgE and IgG B lymphocytes to the regulatory influences of T cells. *J. Immun.* **113**, 974-983, 1974.
- KELLER, R. Concanavalin A, a model "antigen" for the *in vitro* detection of cell-bound reagenic antibody in the rat. *Clin. Exp. Immunol.* **13**, 139-147, 1973.

- KISHIMOTO, T. IgE class-specific suppressor T cells and regulation of the IgE response. *Prog. Allergy* **32**, 265-317, 1982.
- KOKOUREK, J. & V. HOREJSI. Defining a lectin. *Nature* **290**, 188, 1981.
- KOKOUREK, J. & V. HOREJSI. A note on the recent discussion on definition of the term "lectin". Citado por CAUSSE & ROUGÉ, 1983.
- LAYTON, L.L., E.YAMANAHARA & T.W.GREEN. *J. Allergy* **33**, 232-235, 1962. Citado por PERLMAN, 1980.
- LEHRER, S.B. Role of mouse IgG and IgE homocytotropic antibodies in passive cutaneous anaphylaxis. *J. Immunology* **32**, 507-511, 1977.
- LIENER, I.E. Antitryptic and other antinutritional factors in legumes. Off prints from *Nutritional improvement of food legumes by breeding*. Edited by Dr. Max Milner-Published by John Wiley (1967) and sons, 1975.
- LIENER, I.E. Legume toxins in relation to protein digestibility. A review. *J. Food Sci.* **41**, 1076-1081, 1976(a).
- LIENER, I.E. Phytohemagglutinins (Phytolectins). *Ann. Rev. Plant Physiol.* **27**, 291-319, 1976 (b).
- MAGRO, A.M. Involvement of IgE in Con A induced histamine release from human basophils *in vitro*. *Nature* **249**, 572-573, 1974.
- MELCHERS, F., H. von BOEHMER & R.A.PHILLIPS. B-Lymphocyte subpopulations in the mouse. Organ distribution and ontogeny of immunoglobulin synthesizing and of mitogen-sensitive cells. *Transpl. Rev.* **25**, 26-58, 1975.

MOTA, I. & D. WONG. Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. *Life Sci.* **8**, 813, 1969.

→ MOREIRA, R.A. *Isolamento e caracterização de uma lectina de Phaseolus vulgaris*. Tese de doutorado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 111pp., 1975.

→ MOREIRA, R.A., A.C.HORTA-BARROS, J.C.STEWART & A. PUSZTAI. Isolation and characterization of a lectin from seeds of *Dioclea grandiflora* Mart. *Planta* **158**, 63-69, 1983.

→ MOREIRA, R.A. & J.C.PERRONE. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol.* **59**, 783-787, 1977.

MUELENAERE, H.J.H. Toxicity and haemagglutinating activity of legumes. *Nature* **206**, 827-828, 1965.

NGAN, J. & L.S. KIND. Suppressor T cells for IgE and IgG in Peyer's patches of mice made tolerant by the oral administration of ovalbumin. *J. Immunol.* **120** (3), 861-865, 1978.

NOMENCLATURE COMMITTEE OF IUB (NC-IUB) AND IUB-IUPAC JOINT COMMISSION OF BIOCHEMICAL NOMENCLATURE (JCBN), Newsletter 1981. *Eur. J. Biochem.* **114**, 1-4, 1981.

OVARY, Z. Cutaneous anaphylaxis in the albinos rat. *Int. Archs Allergy appl. Immunol.* **3**, 292, 1952.

PERLMAN, F. Allergens. In *Toxic constituents of plant foodstuffs*. 2nd, I.E. LIENER, ed., Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, 295-327, 1980.

- PINESS, G.I., H.MILLER, H.D.CARNAHAN, A.R.ALTOSE & R.C. HAWES. Relationships between foods as shown by the skin test in 1,000 children. *J. Allergy* 11(3), 251-265, 1940.
- PIRQUET, C.E. *Munch. med. Wochschr.* 53, 1457, 1906. Citado por SYLVIANE BASSOT: Cultures de mastocytes de souris comme modèle experimental d'études de l'anaphylaxie in vitro et de sa régulation par le Muramyl Dipeptide. Thèse des Hautes études. Laboratoire d'Immunologie cellulaire (A. PARAF). Inst. Pasteur, Paris, 1983.
- PORTER, P., R.KENWORTHY, D.E.NOAKES & W.D.ALLEN. Intestinal antibody secretion in the young pig in response to oral immunization with *Escherichia coli*. *Immunology* 27, 841-853, 1974.
- PROUVOST-DANON, A. Anticorps réagéniques de la souris. Production et propriétés physico-chimiques, immunochimiques et biologiques. Thèse de doctorat d'Etat es Sciences Naturelle. Université Paris VII, 1972.
- PROUVOST-DANON, A. "Etudes de substances allergénisantes chez des semences natives et cultivées du Nord-est brésilien". *Rapport-Synthèse*. CNRS, 1984.
- PROUVOST-DANON, A., R.BINAGHI, S.ROCHAS & Y. BOUSSAC-ARON. Immunochemical identification of mouse IgE. *Immunology* 23 (4), 481-491, 1972.
- PROUVOST-DANON, A., D.MOUTON, A.ABADIE, J.C.MEVEL, & G. BIOZZI. Genetic regulation of IgE and agglutinating antibody synthesis in lines of mice selected for high or low immune responsiveness. *Eur. J. Immunol.* 7, 342-348, 1977.
- PROUVOST-DANON, A., M.SILVA-LIMA & M.Q.JAVIERRE. Active anaphylactic reaction in mouse peritoneal mast cell in vitro. *Life Sci.* 5, 289-297, 1966.

- PROUVOST-DANON, A., J.WICZOLKOWSKA, R.BINAGHI & A. ABADIE. Mouse and rat IgE. Cross sensitization of mast cells and antigenic relationships. *Immunology* **29**, 151-162, 1975.
- PUSZTAI, A., E.M.W. CLARKE, G.GRANT & T.P.KING. The toxicity of *Phaseolus vulgaris* lectins. Nitrogen balance and immunochemical studies. *J. Sci. Food Agric.* **32**, 001-010, 1981.
- PUSZTAI, A., E.M.W. CLARKE & T.P.KING. The nutritional toxicity of *Phaseolus vulgaris* lectins. *Proc. Nutr. Soc.* **38**, 115-121, 1979.
- PUSZTAI, A. & R.PALMER. Nutritional evaluation of kidney beans (*Phaseolus vulgaris*): the toxic principle. *J. Sci. Food Agric.* **28**, 620-623, 1977.
- RESTUM-MIGUEL, N. & A.PROUVOST-DANON. Effects of multiple oral dosing on IgE synthesis in mice: oral sensitization by albumin extracts from seeds of jack fruit (*Artocarpus integrifolia*) containing lectins. *Immunology* **54**, 497-504, 1985.
- RICHET & HÉRICOURT. 1898. Citado por OTTO BIER. Reações de hipersensibilidade. In *Bacteriologia e Imunologia*. 189, Melhoramentos, São Paulo, 1977.
- RICHET, C. & P.PORTIER. De l'action anaphylactique de certains venins. *C. R. Soc. Biol.* **54**, 170, 1902.
- RICHMAN, L.K. Immunological unresponsiveness after enteric administration of protein antigens. In *Immunology of bisal milk*. Filled by P.L.Ogra and D.H.Dayton. Raken Press, New York, 49 pp., 1979.

- RICHMAN, L.K., J.M.CHILLER, W.R.BROWN, D.G.HANSON & N.M. VAZ. Enterically induced immunologic tolerance. I. Induction of suppressor T lymphocytes by intragastric administration of soluble proteins. *J. Immunol.* **121** (6), 2429-2434, 1978.
- RICHMAN, L.K., A.S.GRAEFF, R.YARCHOAN & W.STROBER. Simultaneous induction of antigen-specific IgA helper T cells and IgG suppressor T cells in the murine Peyer's patch after protein feeding. *J. Immunol.* **126** (6), 2079-2083, 1981.
- ROTHBERG, R.M., S.C.KRAFT & S.M.MICHALEK. Systemic immunity after local antigenic stimulation of the lymphoid tissue of the gastrointestinal tract. *J. Immunol.* **111**(6), 1906-1913, 1973.
- SEWELL, H.F., P.G.H.GELL & M.K.BASU. Immune responsiveness and oral immunization. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* **58**, 414-425, 1979.
- SHARON, N. & H. LIS. Lectins: their chemistry and application to immunology. In *The antigens*. M.SELA., ed., Academic Press, New York, San Francisco, London. vol **4**, 429-529, 1977.
- SHARON, N., H. LIS & R. LOTAN. On the structural diversity of lectins. In *Methodologie de la structure et du metabolisme des gliconjugués*. Colloques Internationaux du CNRS **221**(1), 20-27 Juin, 1973, Edition du CNRS, 1974.
- SILVA-LIMA, M., R.A.MOREIRA, V.A.PONTE, H.M.REINALDO, R.H.P. BENEVIDES & A.PROUVOST-DANON. Mast cell degranulation by lectins from brazilian seeds. 4 th International Congress of Immunology, Paris, 1980. Abstract Book 13-3-17.

- SILVA-LIMA, M., A. PROUVOST-DANON, R.A. MOREIRA, R.H.P. BENEVIDES & F.P. BRITO. Degranulation of mast cells by lectin from mucunã (*Dioclea grandiflora* Mart.). III Pan American Biochemistry Congress, México (México), 1981. Abstract Book F-X-51.
- SIRAGANIAN, P.A. & R.P. SIRAGANIAN. Basophil activation by concanavalin A: characteristics of the reaction. *J. Immunol.* **112**(6), 2117-2125, 1974.
- SPIES, J.R., J.F. COULSON, D.C. CHAMBERS, H.S. BERTON, H. STEVENS & J.M. SHIMP. The chemistry of allergens. XI. Properties and composition of natural proteoses isolated from oilseeds and nuts by the CS-1A procedure. *J. Amer. Chem. Soc.* **73**, 3995-4001, 1951.
- STRANNEGARD, O. & A. YURCHISION. Formation of agglutinating and reaginic antibodies in rabbits following oral administration of soluble and particulate antigens. *Int. Archs Allergy appl. Immunol.* **35**, 579-590, 1969.
- THOMAS, H.C. & D.M.V. PARROTT. The induction of tolerance to a soluble protein antigen by oral administration. *Immunology* **27**, 631-639, 1974.
- TRUNEH, A. & F.L. PEARCE. Effect of anti-allergic compounds on histamine release from rat peritoneal mast cells treated with concanavalin A. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* **66**, 76-82, 1981.
- VAZ, N.M., L.C.S. MAIA, D.G. HANSON & J.M. LYNCH. Inhibition of homocytotropic antibody responses in adult inbred mice by previous feeding of the specific antigen. *J. Allergy Clin. Immunol.* **60**(2), 110-115, 1977.
- WELLS, H.G. & T.B. OSBORNE. The biological reactions of the vegetable proteins. *J. Infect. Dis.* **8**, 66-124, 1911.

YOULE, R.J. & A.H.C. HUANG. Identification of the castor bean allergens as the albumin storage proteins in the protein bodies of castor bean. *Plant Physiol.* 61, 1040-1042, 1978.

YOULE, R.J. & A.H.C. HUANG. Albumin storage proteins and allergens in cottonseed. *J. Agric. Food Chem.* 27, 500-503, 1979.

YOULE, R.J. & A.H.C. HUANG. Occurrence of low molecular weight and high cysteine containing albumin storage proteins in oilseeds of diverse species. *Amer. J. Bot.* 68(1), 44-48, 1981.

8 - COMUNICAÇÕES A CONGRESSOS

MODIFICAÇÕES DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA PELA ALIMENTAÇÃO DE CAMUNDONGOS COM FRAÇÕES PROTEICAS E LECTINA DE Dioscorea grandiflora Mart.

D.C. Sousa Nunes, M. Silva Lima, A. Prouvost Dánon* e R. de Azevedo Moreira.

Deptº de Bioquímica e Biologia Molecular/UFC, *Instituto Pasteur/Paris-França.

É fato comprovado que material antigenicamente potente, ingerido por via oral, pode escapar intacto a alterações no trato digestivo e induzir modificações da resposta imune de seres vivos. Recentemente, demonstrou-se que dietas contendo lectinas induziam a síntese de anticorpos da classe IgG, aumentando o interesse deste estudo. No presente trabalho, camundongos foram alimentados através de sonda, com 10 doses de extratos protéicos (ET) e lectina purificada (PIII) de mucunã (D. grandiflora). Os títulos de IgG e IgE foram determinados por anafilaxia cutânea passiva (PCA) em camundongos e ratos respectivamente. Baixos títulos de IgG anti-ET e anti-PIII foram revelados após a ingestão de 10 doses de 100µg de ET e 10µg de PIII e o reforço não induziu aumento destes títulos. Para camundongos alimentados com 100 e 1000µg de ET, os títulos de IgG anti-ET e anti-PIII foram demonstrados. Os títulos de IgG anti-ET foram revelados com 5 dias após a 10ª dose da alimentação com ET, sendo mais elevados nos animais alimentados com 1000µg; o "booster" potencializou a resposta. Nestas condições, IgG anti-PIII apareceu apenas com 10 dias após a 10ª dose de ET. Não houve síntese de IgG anti-PIII em animais alimentados com 1 e 10µg de PIII e nos alimentados com 100 e 1000µg, IgG foi detectada 10 e 5 dias respectivamente após a 10ª dose de PIII. O "booster" não foi eficaz. Estes resultados preliminares confirmam o comprometimento da resposta imune em animais alimentados com lectina e sugerem uma modulação da síntese de IgG pela lectina.

Auxílio financeiro: CNPq.

III Reunião Regional do Nordeste da SBBq.

Natal 05-08 de setembro de 1984.

Caderno de Resumos.