

PROTEÍNAS DE Lablab purpureus (L.) Sweet: ESTUDO DA ATIVIDA-
DE HEMAGLUTINANTE E DA ALERGENICIDADE.

MARIA ERIVALDA FARIAS DE ARAGÃO

5/1/1990
167/19

FORTALEZA - 1990

PROTEÍNAS DE Lablab purpureus (L.) Sweet: ESTUDO DA ATIVIDADE
DE HEMAGLUTINANTE E DA ALERGENICIDADE.

MARIA ERIVALDA FARIAS DE ARAGÃO

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

FORTALEZA - 1990

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.



Maria Erivalda Farias de Aragão

DISSERTAÇÃO APROVADA EM / /



Maria da Guia Silva Lima
Orientadora da Dissertação



Enéas Gomes Filho



José Tadeu Abreu de Oliveira

À tia DONONA, aos meus pais
RAIMUNDO e VILANI e ao meu
esposo ARAGÃO.

Este trabalho foi realizado graças a auxílios das seguintes instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), 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.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), 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 dedicação e sabedoria, com as quais orientou este trabalho e pela amizade e estímulos constantes.

Aos professores ENÉAS GOMES FILHO e JOSÉ TADEU ABREU DE OLIVEIRA, pelas sugestões apresentadas durante a elaboração desta dissertação.

Ao Dr. JOSÉ XAVIER FILHO, pelas valiosas sugestões apresentadas durante o desenvolvimento deste trabalho e pelo estímulo constante.

Agradeço também aos demais professores, colegas e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pelo ambiente de amizade e colaboração.

Meu agradecimento à tia DONONA ("in memorian"), aos meus pais e aos meus irmãos, pelo ambiente de amor e compreensão, no qual eu cresci.

Finalmente sou grata ao meu esposo ARAGÃO pelo amor, apoio e confiança a mim dedicados, como também pela elaboração da análise estatística que foi relevante na interpretação dos resultados deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
<u>LISTA DE FIGURAS</u>	ix
<u>LISTA DE TABELAS</u>	xi
<u>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</u>	xii
<u>RESUMO</u>	xiv
<u>ABSTRACT</u>	xvi
1 - <u>INTRODUÇÃO</u>	1
1.1 - <u>Lectinas</u>	1
1.1.1 - Identificação e Isolamento	1
1.1.2 - Lectinas da Família <u>Leguminosae</u>	3
1.1.3 - Lectinas de <u>Lablab purpureus</u>	5
1.1.4 - Interação de Lectinas com Células	7
1.1.5 - Relação com a Imunologia	10
1.2 - <u>Resposta Imunológica</u>	13
1.2.1 - Considerações Gerais	13
1.2.2 - Hipersensibilidade	14
1.2.3 - Anafilaxia	15
1.2.4 - Regulação da Síntese de Anticorpos Anafilá- ticos	17
1.3 - <u>Objetivo</u>	20
2 - <u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	21
2.1 - <u>Animais</u>	21
2.2 - <u>Vegetal</u>	21
2.3 - <u>Adjuvante</u>	24
2.4 - <u>Reagentes</u>	24
2.5 - <u>Determinação da Proteína</u>	25
2.6 - <u>Determinação da Atividade Hemaglutinante</u>	25
2.7 - <u>Ensaio com EDTA</u>	26
2.8 - <u>Inibição da Atividade Hemaglutinante por Açú- cares</u>	26
2.9 - <u>Cromatografia em Sephadex G-100</u>	26
2.10 - <u>Cromatografia em Coluna de Manose Acoplada a Epoxi-Sepharose-6B-Ativada</u>	27

2.11 - <u>Eletroforese em gel de Poliacrilamida com SDS e β-mercaptoetanol em Placas</u>	28
2.12 - <u>Eletroforese em gel de Poliacrilamida com SDS em Tubos</u>	29
2.13 - <u>Imunização por Via Subcutânea</u>	29
2.14 - <u>Obtenção de Antissoros</u>	30
2.15 - <u>Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA)</u>	30
2.15.1 - <u>Reações de Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA) para IgG₁ em Camundongos</u>	30
2.15.2 - <u>Reações de Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA) para IgE em Ratos</u>	31
2.16 - <u>Esquema Experimental</u>	31
2.17 - <u>Análise Estatística</u>	32
3 - <u>RESULTADOS</u>	34
3.1 - <u>Descrição da Semente de <i>Lablab purpureus</i></u>	34
3.2 - <u>Teor de Proteína e de Atividade Hemaglutinante das Frações</u>	34
3.3 - <u>Atividade Hemaglutinante do Extrato Total em Diferentes Animais</u>	38
3.4 - <u>Ação dos Íons Ca²⁺ e Mn²⁺ na Atividade Hemaglutinante do Extrato Total</u>	38
3.5 - <u>Inibição da Atividade Hemaglutinante por Açúcares</u>	38
3.6 - <u>Cromatografia em Sephadex G-100</u>	41
3.7 - <u>Cromatografia com Manose Acoplada a Epoxi-Sepharose-6B-Ativada</u>	45
3.8 - <u>Eletroforese</u>	45
3.9 - <u>Resposta do Tipo IgG₁ Induzida em Animais Imunizados com o Extrato Total e com a Ovalbumina</u>	47
3.10 - <u>Resposta do Tipo IgE Induzida em Animais Imunizados com o Extrato Total e com a Ovalbumina</u>	50
3.11 - <u>Resposta do Tipo IgG₁ Induzida em Animais Imunizados com as Frações Protéicas</u>	50
3.12 - <u>Resposta do Tipo IgE Induzida em Animais Imunizados com as Frações Protéicas</u>	52
4 - <u>DISCUSSÃO</u>	56

5 - <u>CONCLUSÕES</u>	65
6 - <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	67
7 - <u>COMUNICAÇÃO A CONGRESSO E TRABALHOS PUBLICADOS.</u>	79
8 - <u>ANEXOS</u>	86

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
01 Desencadeamento da desgranulação de mastócitos como uma consequência de ligações cruzadas entre receptores da porção Fc da IgE (Fc ^E)	9
02 Esquema global para a hipersensibilidade do tipo I	16
03 Fracionamento do extrato total por precipitação com sulfato de amônio	23
04 Sementes de <u>Lablab purpureus</u> (L.) Sweet	35
05 Cromatografia em Sephadex G-100 do extrato total	42
06 Cromatografia em Sephadex G-100 da fração F30-40 %	43
07 Cromatografia em Sephadex G-100 da fração F0-50 %	44
08 Cromatografia em coluna de manose acoplada a Epoxi-Sepharose-6B ativada	46
09 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS	48
10 Resposta do tipo IgG ₁ em camundongos imunizados com o extrato total (ET) e com a ovalbumina (OVA)	49
11 Resposta do tipo IgE em camundongos imuniza-	

dos com o extrato total (ET) e com a ovalbu- mina (OVA)	51
12 Resposta do tipo IgG ₁ em camundongos imuniza- dos com as frações: F0-50 %, F50-70 % e F70- 90 %	53
13 Resposta do tipo IgE em camundongos imuniza- dos com as frações: F0-50 %, F50-70 % e F70- 90 %	54

LISTA DE TABELAS

TABELA	Página
01 Teor protéico e atividade hemaglutinante do ET e das frações protéicas do ET obtidas por precipitação com sulfato de amônio	36
02 Teor protéico e atividade hemaglutinante das frações F0-30 %, F30-40 % e F40-50 %	37
03 Atividade hemaglutinante do ET em diferentes animais	39
04 Inibição da atividade hemaglutinante do ET por açúcares	40

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

AHE	Atividade hemaglutinante específica adquirida através da fórmula: $AHE = \frac{n^{\circ} \text{ de UH}}{\text{mg de proteína}}$
ConA	Concanavalina A
EDTA	Ácido etileno diamino tetra-acético
ET	Extrato total ou proteínas totais obtidas das sementes de <u>Lablab purpureus</u> por extração com PBS
F0-30 %	Fração do ET precipitada com sulfato de amônio com 30 % de saturação
F30-40 %	Fração do ET precipitada com sulfato de amônio no nível de saturação entre 30 e 40 %
F40-50 %	Fração do ET precipitada com sulfato de amônio no nível de saturação entre 40 e 50 %
F0-50 %	Fração do ET precipitada com sulfato de amônio com 50 % de saturação
F50-70 %	Fração do ET precipitada com sulfato de amônio no nível de saturação 50 e 70 %
F70-90 %	Fração do ET precipitada com sulfato de amônio no nível de saturação 70 e 90 %
I ₅₀ %	Menor concentração de um açúcar capaz de inibir 50 % de hemaglutinação
IgG ₁	Imunoglobulina G, subclasse gama-1

IgE	Imunoglobulina E
OVA	Ovalbumina
PBS	Tampão fosfato de potássio 0,025 M contendo NaCl 0,15 M e pH 7,4
PCA	Anafilaxia cutânea passiva
Pico I	Primeiro pico obtido através de cromatografia em Sephadex G-100
Pico II	Segundo pico obtido através de cromatografia em Sephadex G-100
SDS	Dodecil sulfato de sódio
UH	Unidade de hemaglutinação definida como a menor quantidade de amostra por ml capaz de dar uma forte reação de hemaglutinação de 2 + (50 %)

RESUMO

O extrato total obtido de sementes de feijão mangalô (Lablab purpureus) após extração da farinha das sementes com PBS apresentou atividade hemaglutinante. Pelas características da inibição da atividade hemaglutinante por carboidratos específicos foi atribuída a uma lectina a indução desta atividade. Tentativas de purificação da lectina foram feitas através do fracionamento com sulfato de amônio e cromatografia em gel de Sephadex G-100.

Através da precipitação com sulfato de amônio conseguiu-se concentrar 70 % da atividade hemaglutinante na fração F0-50 %. Com uma precipitação adicional com sulfato de amônio nos níveis de saturação 0-30 %, 30-40 % e 40-50 %, 28,4 % da atividade hemaglutinante ficou retida na fração F30-40 %. Quando esta fração foi passada através de uma coluna de Sephadex G-100 houve o aparecimento de dois (02) picos, sendo que a Atividade Hemaglutinante Específica (AHE) do pico II foi maior do que a do pico I. Analisando-se o eluato do pico II por eletroforese em gel de poliacrilamida foram detectadas apenas 4 bandas cujos pesos moleculares variavam de 12.000 a 22.000 daltons.

O extrato total induziu aglutinação de hemácias de coelho e humanas, sendo mais eficaz com as hemácias de coelho. A aglutinação das hemácias humanas foi inespecífica no que diz respeito aos grupos sanguíneos A, B e O. Não foi detectada aglutinação de hemácias de camundongos, nem de cobaias, nem de carneiros pelo extrato total.

A atividade hemaglutinante do extrato total foi inibida principalmente pelos açúcares N-acetil-D-glicosamina e α -metil-D-manosídeo, seguido pela D-glicosamina, D-manose e D-glicose. Os açúcares N-acetil-D-galactosamina, lactose, melibiose, rafinose e L-fucose não inibiram a atividade hemaglutinante.

A adição dos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} 1,25 mM não aumentou a atividade hemaglutinante do extrato total. No entanto, quando a fração F0-50 % foi dialisada contra PBS contendo EDTA 0,01 M, a atividade hemaglutinante foi totalmente bloqueada, sendo readquirida pela adição dos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} 1,25 mM, sugerindo ser a lectina uma metaloproteína, sendo os íons Ca^{2+} e Mn^{2+} necessários à sua atividade.

A(s) lectina(s) presente(s) neste extrato não se prenderam em coluna de Sephadex G-100, nem na coluna de manose acoplada a epoxi-Sepharose-6B embora a atividade hemaglutinante do extrato total tenha sido inibida pela D-glicose e pela D-manose.

A antigenicidade do extrato total na presença e na ausência de adjuvante, como também a das frações F0-50 %, F50-70 % e F70-90 % foi estudada em camundongos quantificando-se a síntese de IgG_1 e IgE séricas através da reação de PCA. O extrato total, bem como as frações são bastantes imunogênicas quando comparadas a um antígeno padrão como a ovalbumina.

Quando se observou os títulos mais elevados de IgE induzidos pelo extrato comparados aos induzidos por ovalbumina na ausência do adjuvante, fez-se a suposição de que se estaria diante de uma imunomodulação induzida pela lectina presente no extrato de Lablab purpureus. É bem conhecida a capacidade de imunomodulação das lectinas através de suas propriedades mitogênicas. Esta hipótese foi reforçada pela observação dos títulos de IgE induzidos pelas frações proteicas, agora mais purificadas, onde estes títulos foram mais elevados quando induzidos pelas frações dotadas de maior atividade hemaglutinante.

ABSTRACT

A protein full extract of mangalô beans (Lablab purpureus) obtained by PBS extraction of the meal shows haemagglutinating activity. By the fact carbohydrates specifically inhibit this haemagglutination it has been ascribed to one lectin the induction of such activity. A number of attempts were done in order to purify the lectins through ammonium sulphate fractionation and chromatography in Sephadex G-100 gel. The fractionation with ammonium sulphate resulted in a concentration of the haemagglutinating activity in the F0-50 %. After further fractionation with ammonium sulphate at the levels of 0-30 %, 30-40 % and 40-50 %, 28,4 % of the haemagglutinating activity was found in the F30-40 %. When a Sephadex G-100 gel column was loaded with a sample of F30-40 % two protein peaks were obtained and the specific haemagglutinating activity was higher in peak II than in peak I. The analysis of peak II through eletrophoresis in polyacrylamide gel showed the presence of only four bands with molecular weights ranging between 12.000 and 22.000 daltons.

The full extract induced agglutination of both rabbit and human erythrocytes and such agglutination was more potent with rabbit erythrocytes. Human erythrocytes were agglutinated without specificity towards the ABO blood groups. Agglutination was not detected by using either mouse, guinea pig or sheep erythrocytes.

The haemagglutinating acitivity of the full extract was mainly inhibited by the sugars: N-acetyl-D-glucosamine and α -metil-D-mannoside followed by glucosamine, D-mannose and D-glucose. The sugars N-acetyl-D-galactosamine, lactose, melibiose, raffinose and L-fucose did not inhibit the haemagglutinating activity.

The haemagglutinating activity was not altered by

1.25 mM Ca^{2+} and Mn^{2+} . However, when the F0-50 % was dialysed against PBS containing 0.01 M EDTA the haemagglutination was abolished but it was recovered when 1.25 mM Ca^{2+} and Mn^{2+} were added. This result suggests that the lectin is a metalloprotein being Ca^{2+} and Mn^{2+} necessary to its activity.

The lectin(s) present in this extract did not bind to a Sephadex G-100 column neither to a column of mannose bound to epoxi-Sepharose-6B despite of the haemagglutinating activity of the full extract has been inhibited by D-glucose and D-mannose.

The antigenicity of the full extract admixed with and without adjuvant to mice was studied as well the antigenicity of the protein fractions F0-50 %, F50-70 % and F70-90 % by determining the titles of IgG_1 and IgE synthesis with PCA reactions. The full extract and the protein fractions are good immunogens as compared to ovalbumin, considered as a standard antigen.

When the higher titles of IgE induced by the full extract were compared to the ones induced by ovalbumin in the absense of adjuvant we supposed that this was due to an immunomodulating effect induced by the presence of the lectin in the extract of Lablab purpureus seeds. Is is well known the immunomodulating capacity of lectins through their mitogenic properties. This hypothesis of immune modulation was emphasized by the IgE titles induced by the protein fractions, now more purified, where these titles were more elevated when induced by the fractions with higher haemagglutinating activity.

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Lectinas

1.1.1 - Definição e Isolamento

Os primeiros estudos a respeito destas proteínas foram feitos por STILIMARK (1888) quando pesquisava a presença de substâncias tóxicas em sementes de mamona (Ricinus communis). Ele observou que a ricina, uma fração protéica parcialmente purificada destas sementes, levava as hemácias a um estado de aglutinação semelhante ao verificado no processo da coagulação. ELFSTRAND (1898) chamou de "hemaglutininas" estas proteínas, devido à similaridade com as aglutininas do soro humano. Posteriormente foi observado que muitas hemaglutininas aglutinavam de maneira específica as hemácias humanas no que diz respeito aos grupos sanguíneos (BOYD & REGUERA, 1949). Esta especificidade levou BOYD & SHARPLEIGH (1954) a sugerirem para estas substâncias o nome de lectina (do latim legere = escolher) que sobrevive até nossos dias.

WATKINS & MORGAN (1952) por sua vez mostraram que açúcares simples inibiam de maneira específica a atividade das lectinas. Esta descoberta levou ao reconhecimento que os receptores de superfície de membranas celulares aos quais as lectinas se ligam são constituídos de carboidratos. De posse deste novo conhecimento foram formuladas as primeiras definições de lectinas. De acordo com GOLDSTEIN et al. (1980) "lectinas são proteínas (ou glicoproteínas) de natureza não imunológica que aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados". Com o intuito de incluir nesta definição as proteínas monovalentes ligantes de açúcares, KOCOUREK & HOREJSI

(1981) redefiniram lectinas como "proteínas de origem não imunológica capazes de reconhecer especificamente e ligar-se reversivelmente a moléculas de carboidratos sem alterar a estrutura do ligante reconhecido".

A definição de lectinas ainda tem suscitado muitas controvérsias. Recentemente, BARONDES (1988) expressou sua opinião de que tal definição deve ser reavaliada levando-se em consideração a presença nestas proteínas de um sítio de ligação para outra substância que não seja um carboidrato. Este sítio parece ser importante para muitas das funções endógenas das lectinas e este fato deveria, ainda segundo BARONDES (1988), ser considerado em uma definição futura.

Quando se deseja estudar os efeitos biológicos exercidos pelas lectinas, é mais apropriado usar-se um material purificado. As etapas de purificação de lectinas usualmente são aquelas estabelecidas para as proteínas em geral: extração com um tampão apropriado, seguido ou não por precipitação com sais e cromatografias. Atualmente, o método da cromatografia de afinidade é o mais usado. Neste tipo de cromatografia, o açúcar que se liga especificamente à lectina que se deseja isolar é covalentemente acoplado a um suporte sólido e servirá para reter a lectina presente entre outras proteínas em solução. A lectina será eluída da coluna por açúcares que competem pelos sítios de ligação da lectina ou através de alterações da natureza do eluente, baixando-se o pH ou aumentando-se a força iônica.

Tem-se hoje uma enorme variedade de colunas de afinidade. O acoplamento do açúcar específico com a epoxi-Sepharose-6B ativada dá origem a colunas de afinidade para a purificação de uma enorme quantidade de lectinas, como a lectina de germe de trigo, cujo açúcar usado é o N-acetil-D-glicosamina (VRETBLAD, 1976).

Muitas vezes a própria resina é usada por apresentar afinidade para algum tipo de lectina. Este é o caso dos esquemas de purificação que empregam o gel de Sephadex como cromatografia de afinidade para lectinas com especificidade para glicose ou manose, como a lectina de Dioclea grandiflora

(HORTA-BARROS, 1982). Agarose também tem sido usada para a purificação de lectinas com especificidade para galactose, como ricina e abrina (NICHOLSON & BLAUSTEIN, 1974; OLSNES & PHIL, 1973). Quitina é usada com sucesso para separar lectinas com especificidade para N-acetil-D-glicosamina, como a lectina de germe de trigo (BLOCH & BURGER, 1974).

Outros tipos de cromatografia de afinidade resultam do tratamento prévio dos suportes, como é o caso de uma lectina, específica para galactose, que foi isolada de Crotalaria juncea por uma cromatografia de afinidade bioespecífica, usando-se gel de agarose previamente tratado com HCl 0,2 M (ERSSON et al., 1973).

Existem ainda várias outras alternativas no método de cromatografias de afinidade, como o uso de estromas de eritrócitos glutarizados como adsorventes (OLIVEIRA, 1980), ou até mesmo o uso de glicoproteínas insolubilizadas (TERNYNCK & AVRAMEAS, 1987). Enfim, o aprimoramento das colunas de afinidade tem tornado possível a purificação de uma variedade cada vez maior de lectinas.

1.1.2 - Lectinas de Plantas da Família Leguminosae

Embora todos os grupos taxonômicos do reino vegetal possam ter lectinas, de todas as plantas até agora estudadas, aquelas pertencentes à família Leguminosae foram as fontes mais ricas destas proteínas (PUSZTAI et al., 1983).

Algumas lectinas de leguminosas tiveram suas sequências de aminoácidos determinadas e mostraram grande homologia, principalmente em suas sequências de aminoácidos terminais, o que reflete que as lectinas têm sido conservadas durante a evolução das plantas (STROSBERG et al., 1983). Além disto, tais lectinas, quando comparadas com a concanavalina A (ConA), revelaram um alto grau de conservação nas porções de sequências correspondentes àquelas regiões da ConA importantes para a estabilização das estruturas terciárias e secundárias, para associação de subunidades e pa-

ra ligações com íons metálicos, bem como, com ligantes hidrofóbicos (BECKER et al., 1983). Entretanto, elas mostram sítio de ligação de carboidratos diversificados, enfatizando as diferentes especificidades por carboidratos (GOLDSTEIN & HAYES, 1978).

Muitas plantas da família Leguminosae possuem mais de uma lectina (BAUMANN et al., 1979). Em muitos casos, como ocorre com as lectinas de Arachis hypogaea (PUEPPKE, 1979), elas estão sob formas moleculares altamente relacionadas, chamadas isolectinas. Elas parecem funcionalmente homogêneas, em virtude de se ligarem a um mesmo sacarídeo. No entanto, uma análise eletroforética das lectinas purificadas pode revelar grandes variações. A origem destas variações pode ser atribuída a polimorfismo genético, modificações pós-sintéticas, como clivagens e/ou glicosilação e polimorfismo de espécies (LIENER et al., 1986).

As lectinas de leguminosas estão localizadas principalmente nas sementes, onde chegam a constituir cerca de 10 % da proteína solúvel (LIENER, 1976). Elas estão primariamente localizadas em organelas conhecidas como corpos protéicos. Devido à localização nos corpos protéicos e ao fato da lectina de Phaseolus vulgaris desaparecer juntamente com as proteínas de reserva (MIALONIER et al., 1973), confirmando a tese proposta por Von EISLER & Von PROTHEIM (1911), foi sugerido que a função das lectinas nas plantas seria de proteínas de reserva. No entanto, esta tese foi contestada diante das várias exceções registradas, por exemplo, a da lectina de germe de trigo que, além de ser restrita ao embrião, o seu nível permanece alto, mesmo nos estágios finais de germinação (MISHKIND et al., 1980). Esta localização sugere para as lectinas um papel de defesa contra agentes patogênicos (MIRELMAN et al., 1975).

Lectinas de hipocótilo de Phaseolus aureus foram encontradas em membranas do retículo endoplasmático e do Complexo de Golgi, o que pode sugerir para estas lectinas um papel na síntese e transporte de componentes da parede celular (BOWLES & KAUSS, 1976). Phaseolus vulgaris possui também lectina sob a superfície da raiz, particularmente nos

pelos (HAMBLIN & KENT, 1983), e por esta razão foi-lhe atribuído o papel de reconhecimento de bactérias fixadoras de nitrogênio na superfície da raiz (SCHMIDT, 1979).

Outras funções biológicas atribuídas às lectinas são as de: transporte de açúcares ou glicoproteínas em plantas (BOYD, 1963) e estimuladores mitogênicos de células embrionárias (HOWARD et al., 1972). Contudo, esta última alternativa não está ainda bem assegurada (ETZLER, 1985).

1.1.3 - Lectinas de Lablab purpureus

A espécie Dolichos lablab (L.) pertencente à família Leguminosae, subfamília Papilionoidae, foi reclassificada por Sweet, recebendo atualmente a denominação de Lablab purpureus (L.) Sweet. Mesmo assim, no presente trabalho será mantida a denominação Dolichos lablab quando forem citados os trabalhos originais que usaram esta denominação.

KUMAR & RAO, (1986) detectaram a presença de lectinas em duas variedades de Dolichos lablab, a typicus e a lignosus. As duas lectinas possuem especificidade pelos mesmos açúcares e foram isoladas pelo mesmo método. No entanto, as lectinas isoladas de Dolichos lablab na França FAVERO et al., 1986) e Turquia (GÜRAN et al., 1983) possuem especificidade por açúcares diferentes e não foram isoladas pelos mesmos métodos. Apesar das diferenças quanto à especificidade por açúcares e método de isolamento, as lectinas de Dolichos lablab foram semelhantes em muitos aspectos. Elas geralmente apresentam 4 subunidades, sendo que os pesos moleculares são variados, embora se mantenham dentro do limite de 15000 a 40000 daltons. Estas lectinas são glicoproteínas e apresentam em sua estrutura íons, como Mn^{2+} e Zn^{2+} (GÜRAN et al., 1983) e Mn^{2+} , Mg^{2+} e Ca^{2+} (KUMAR & RAO, 1986). Aparentemente estes íons não são removidos no processo de purificação, pois a atividade hemaglutinante não é aumentada pela adição dos mesmos (GÜRAN et al., 1983; KUMAR & RAO, 1986).

KUMAR & RAO, (1986) demonstraram que a lectina

isolada das sementes originadas da Índia não contém o aminoácido cistina em sua composição, o que garante que as subunidades são ligadas entre si apenas por forças intermoleculares e não por ligações covalentes.

As lectinas de Dolichos lablab aglutinam de maneira inespecífica, hemácias humanas dos grupos A, B e O e aglutinam também hemácias de outros animais (SILVA-LIMA et al., 1988; GURAN et al., 1983; KUMAR & RAO 1986).

FAVERO et al., (1986) conseguiram isolar de sementes do Dolichos lablab uma lectina que tem-se mostrado ser melhor mitógeno para linfócitos T humanos que a conA. Esta lectina, mostrou-se também um ótimo agente indutor de síntese e de secreção de interleucina-II.

Embora as lectinas de sementes de Dolichos lablab, em sua maioria, tenham sua atividade hemaglutinante inibida por glicose, os resultados obtidos nas tentativas de isolá-las através de cromatografia em gel Sephadex foram polêmicos. GURAN et al., (1983) e KUMAR & RAO, (1986) não conseguiram isolar a lectina por esse meio. Contudo, FAVERO et al., (1986) referem ter obtido uma boa separação com tal método.

Em estudos feitos com ratos e camundongos sobre a toxicidade de aglutininas presentes em legumes oriundos da Índia, os efeitos tóxicos da hemaglutinina do Dolichos lablab foram observados mesmo quando os animais eram alimentados com uma dieta contendo apenas 1% de lectina (MANAGE et al., 1972).

SILVA-LIMA et al., (1988) detectaram atividade hemaglutinante em um extrato bruto de sementes de Lablab purpureus oriundas do Estado da Bahia e demonstraram ser esta(s) presumível(eis) lectina(s) diferente daquelas já isoladas, no tocante à especificidade por açúcares. O extrato bruto tem sua atividade hemaglutinante preferencialmente inibida por N-acetil-D-glicosamina e α -metil - D-manosídeo, seguido por D-manose e D-glicose. Estes resultados mostraram que a inibição da atividade por N-acetil-D-Glicosamina e α -metil-D-manosídeo era igual a da lectina de sementes oriundas da Turquia e a inibição por glicose e manose era a

mesma encontrada na lectina de sementes provenientes da Índia. Portanto, o perfil de inibição por açúcares da atividade hemaglutinante do extrato bruto de sementes oriundas da Bahia parece ter as características do perfil das duas outras sementes de diferentes procedências, sendo inibido quer por açúcares complexos, como na lectina de sementes da Turquia, quer por açúcares simples, como nas lectinas de sementes da Índia. Além disso, a lectina não se prendeu ao gel de Sephadex G-100, o que está de acordo com as lectinas isoladas na Índia e na Turquia. O extrato bruto aglutina, de maneira inespecífica, hemácias humanas com respeito aos grupos sanguíneos A, B e O. PROUVOST-DANON *et al.*, (1990) demonstraram que o extrato bruto, bem como as frações parcialmente purificadas ricas em atividade hemaglutinante, do Lablab purpureus oriundo da Bahia, estimulam a liberação de histamina de basófilos humanos e mastócitos de camundongos, sendo que Lablab purpureus mostrou-se mais eficiente que a conA no estímulo à liberação de histamina por basófilos humanos. Por outro lado, a conA foi mais eficiente na liberação de histamina por mastócitos peritoneais de camundongos. A liberação de histamina induzida por Lablab purpureus foi inibida mais fortemente por N-acetil-D-glicosamina, seguida de manose e glicose.

O extrato total do Lablab purpureus oriundo da Bahia, foi eficiente em promover a proliferação de células esplênicas de camundongos e ativou particularmente os linfócitos T (RUMJANEK, comunicação pessoal).

1.1.4 - Interação de Lectinas com Células

A capacidade que têm as lectinas de se ligarem de forma específica a diferentes células, tem feito destas moléculas um valioso instrumento em pesquisas médicas e biológicas. Elas são utilizadas com grande eficiência na tipagem sanguínea, uma vez que chegam a distinguir subgrupos de hemácias, como é o caso da lectina de Dolichos biflorus que

reage mais fortemente com as hemácias do tipo A₁ que com aquelas do tipo A₂ (ETZLER & KABAT, 1970). A lectina de soja aglutina células responsáveis pelas reações do enxerto com o hospedeiro nos transplantes de medula tornando possível o transplante entre indivíduos geneticamente diferentes (REISNER, 1987).

Certas lectinas têm também a propriedade de ligarem-se à porção carboidrato da fração Fc da imunoglobulina E (IgE) (SIRAGANIAN & SIRAGANIAN, 1975). Sabe-se que ligações cruzadas entre antígenos, imunoglobulinas anti-imunoglobulinas ou lectinas com IgE de superfície de membrana de mastócitos ou basófilos, levam estas células a processo de exocitose com liberação de substâncias vasoativas, como serotonina e histamina (ROIT et al., 1988). As lectinas podem ainda efetivar desgranulação em células basófilos ou mastócitos através de ligações cruzadas com os receptores de superfície de membrana para IgE (HELIN & FROESE, 1981), ou simplesmente agindo como antígeno (ALBUQUERQUE, 1987) (FIGURA 01). ConA induz liberação de histamina de basófilos e mastócitos de muitos animais (SIRAGANIAN & SIRAGANIAN, 1975).

As lectinas parecem ligar-se a receptores de superfície de células para insulina e mimetizam o efeito insulínico em muitos tecidos, como por exemplo, estimulando a lipogênese no tecido adiposo (LIVINGSTON & PURVIS, 1980).

De todas as interações de lectinas com células, a mais importante do ponto de vista imunológico é a que se estabelece com os linfócitos resultando em ação mitogênica. A estimulação mitogênica por lectinas tem sido usada para estudos sobre os eventos bioquímicos que ocorrem durante a maturação de linfócitos, bem como avaliação da imunocompetência de pacientes com doenças que comprometem o sistema imunológico, como a AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) (SHARON & LIS, 1987).

Os linfócitos estimulados por lectinas são também utilizados para estudos de cromossomos pelo fato dos mesmos se apresentarem de modo facilmente identificáveis durante o processo de proliferação (SHARON & LIS, 1972).

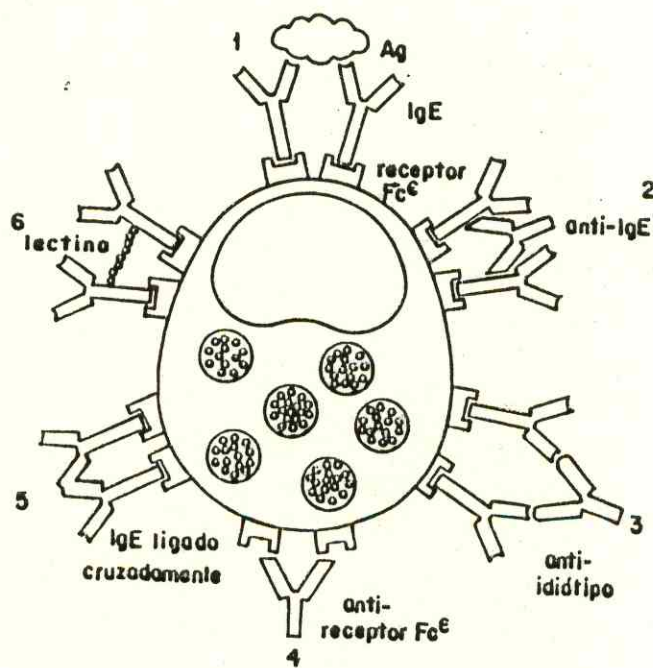


FIGURA 01 - Desencadeamento da desgranulação de mastócitos como uma consequência de ligações cruzadas entre os receptores da porção Fc da IgE (Fc^E). Estas ligações podem ser feitas por: (1) Antígenos (Ag) ligando-se as IgEs específicas presas aos receptores Fc^E; (2) Anticorpos anti-Fc^E; (3) Anticorpos anti-idiotípicos para os idiótipos de IgE; (4) Anticorpos anti-receptor Fc^E; (5) Ligações covalentes entre os dímeros de IgE e (6) Lectinas ligando-se a resíduos de açúcares da Fc^E. (ROIT et al., 1988).

Para que uma célula T citotóxica lise uma célula alvo é necessário o reconhecimento específico pelas células efetoras de antígenos do complexo de histocompatibilidade principal das células-alvo. No entanto, na presença de uma lectina que seja um mitógeno do tipo T, como a conA, várias células que não sejam antigenicamente relacionadas com as células alvo são lisadas pelos linfócitos T citotóxicos. O papel das lectinas nesta citotoxicidade mediada por células T dependente de lectinas, foi sugerido ser de "ativação" da célula efetora que expressa o seu potencial citotóxico e favorecer a "ligação" da célula efetora com sua célula-alvo (GREEN *et al.*, 1978).

As lectinas podem promover uma ligação carboidrato específica entre macrófagos e células tumorais induzindo a morte destas últimas por fagocitose pelos macrófagos, de forma semelhante aos anticorpos anti-tumor que também induzem a lise do tumor mediada por macrófago (KURISU *et al.*, 1980). Além da fagocitose das células tumorais, as lectinas promovem a fagocitose pelos macrófagos de outros tipos de células (SHARON, 1984). Outros efeitos marcantes de lectinas interagindo com células são os de inibição do crescimento de fungos patogênicos, (MIRELMAN *et al.*, 1975) e inibição da migração de células tumorais (LIS & SHARON, 1977).

Embora se diga que as lectinas possuem a propriedade de ligar-se à superfície de membranas celulares, através de receptores específicos, os vários efeitos biológicos sobre as células não são exercidos por todas as lectinas indistintamente.

1.1.5 - Relação com a Imunologia

ERLICH (1891) foi quem primeiro estudou as propriedades imunogênicas das lectinas. Ele observou que coelhos alimentados com sementes de jequiriti adquiriram uma certa imunidade contra abrina e que esta imunidade era aumentada com a administração parenteral desta proteína. ERLICH

(1891) demonstrou que proteínas encontradas no soro dos animais imunizados precipitavam a abrina de maneira específica e não reagiam com a ricina. Ele observou também que o antissoro inibia a atividade hemaglutinante da proteína e que havia uma relação entre a quantidade de soro e a quantidade do antígeno a ser neutralizado. Outra observação importante foi o fato de que a imunidade contra as toxinas era transferida da mãe para o filho através do sangue durante a gravidez e do leite após o nascimento. Portanto, ERLICH (1981) conseguiu demonstrar a natureza antigênica das lectinas com que trabalhava e comprovou mais uma vez a especificidade da resposta imunológica.

Apesar das inúmeras e variadas propriedades encontradas nas lectinas, elas não despertaram maior atenção até que na década de 60, duas evidências experimentais, pela relação com problemas que afetavam diretamente o bem-estar do homem, mudaram o rumo da história das mesmas: NOWEL (1960) descobriu a atividade mitogênica da lectina de Phaseolus vulgaris (PHA) e AUB et al. (1963, observaram que a aglutinina de germe de trigo (WGA) aglutinava especificamente células malignas. Ainda neste domínio, foi de grande relevância a descoberta da mitogenicidade da conA e que esta atividade podia ser inibida por baixas concentrações de açúcares (BECKERT & SHARKEY, 1970; LIS E SHARON, 1977).

Segundo SHARON (1976) se todas as lectinas forem analisadas de forma apropriada elas podem estimular os linfócitos a crescerem e proliferarem. Esta propriedade das lectinas foi usada como um importante instrumento nos estudos da imunologia. A mitogenicidade das lectinas difere daquela apresentada pelos antígenos, no tocante à especificidade. Os antígenos funcionam como ativadores monoclonais, onde o linfócito estimulado irá dar origem a um clone de células específicas para o antígeno. Já as lectinas funcionam como ativadores policlonais, ou seja, elas ativam vasta população de linfócitos (BUIN-MORENO & CAMPOS-NETO, 1981).

Além dos eventos observados em células em estado de crescimento e divisão, os linfócitos estimulados liberam produtos biologicamente ativos chamados linfocinas que de-

semprenham um importante papel na resposta imunológica dependente de linfócitos T (COHEN et al., 1979).

As lectinas apresentam certa especificidade no tocante às diferentes populações de linfócitos que elas estimulam. A grande maioria das lectinas estudadas, estimula apenas a população de linfócitos T, como PHA e conA (DOUGLAS et al., 1969; OPPENHEIM & ROSENSTREICH, 1976), mas existem outras que estimulam apenas linfócitos B, como aquela encontrada na hemolinfa de lagosta (Homarus americanus) (CAMPBELL et al., 1982) e ainda aquelas que estimulam linfócitos T e B, como a lectina de lentilha (MILLER, 1983). Alguns mitógenos de linfócitos T, como a conA, estimulam linfócitos B a se multiplicarem na presença de linfócitos T, o que leva a crer que esta ativação é mediada por fatores solúveis, produzidos pelos linfócitos T estimulados (ANDERSSON et al., 1972).

As lectinas podem ter sobre os linfócitos um efeito oposto ao de proliferação. É o caso da lectina de Agaricus bisporus que suprime a síntese de DNA e a produção de imunoglobulinas pelos linfócitos T e B, respectivamente (GREENE et al., 1981). Baseado nestes resultados, GREENE et al., (1981) sugeriram que existem receptores na membrana dos linfócitos aos quais se ligam os respectivos supressores gerando um sinal intracelular negativo que culmina com a supressão do metabolismo das células T e B.

O efeito imunomodulador das lectinas sobre a resposta humoral, tem sido extensivamente estudado. ASTORQUIZA & SAYAGO (1984) demonstraram que PHA estimula a produção de IgE em camundongos imunizados com ovalbumina (OVA) e que este efeito é dependente do tempo de aplicação do PHA. ConA também estimula a produção de IgE em camundongos com OVA e este estímulo é dependente da dose de conA aplicada (GOLLAPUDI & KIND, 1975). ConA em doses baixas induz a formação de células T supressoras, em camundongos e ratos, mais que outras células T, suprimindo assim a produção de algumas imunoglobulinas, como IgG e IgM, pelas células B (ELSON et al., 1979). A lectina de germe de trigo, um mitógeno de células B, pode direcionar estas células a produzirem "in vitro",

IgG e IgE (ZURAW et al., 1981). A jacalina, uma lectina presente em Artocarpus integrifolia, mostrou ser capaz de exercer um efeito imunomodulador dependente de dose sobre a síntese de anticorpos do tipo IgE em camundongos, mas não exerceu esse efeito sobre as imunoglobulinas do tipo IgG₁ (ALBUQUERQUE, 1987).

O modelo mais aceito para explicar o mecanismo de proliferação de linfócitos T por lectinas mitogênicas, é um modelo de 02(dois) sinais no qual as lectinas induzem os linfócitos T a deixarem a fase estacionária (Go) do ciclo celular e entrar na fase G₁, onde eles crescem e sintetizam proteínas e RNA(blastogênese). Para que os linfócitos entrem na fase S do ciclo celular, onde começa a síntese de DNA, é necessário um segundo sinal. Este segundo sinal é iniciado pela interleucina-I produzida por células acessórias do sistema imunológico, mais particularmente, os macrófagos. A interleucina-I age sobre os linfócitos T induzindo a produção de interleucina-II e o aparecimento de receptores de superfície para interleucina-II sobre os linfócitos T. Como resultado do segundo sinal (interleucina-II), células T passam de G₁ a S e completam o ciclo. Divisões subsequentes requerem agora somente a presença de interleucina-II (KLAUS & HAWRYLOWICZ, 1984).

1.2 - Resposta Imunológica

1.2.1 - Considerações Gerais

Ao longo da evolução, os organismos desenvolveram mecanismos que os manteriam em equilíbrio com o meio externo. A grande variedade de agentes infecciosos, tais como vírus, bactérias e fungos, poderia matar o hospedeiro, se este não tivesse desenvolvido o sistema imunológico. A resposta imunológica é pois, um mecanismo de defesa existente nos mamíferos e em grande parte dos organismos superiores,

não apenas contra organismos patogênicos, mas também contra uma variedade de substâncias, tais como pólenes, células e pelos. Os mecanismos efetores da resposta imunológica incluem desde a combinação de anticorpos com antígenos (imunidade humoral), à estimulação das células que participam da reação inflamatória ou de moléculas solúveis, até fenômenos biológicos, como lise celular e fagocitose. Outros mecanismos incluem ainda aqueles mediados por células T (imunidade celular), que através da secreção de linfocinas, produzem reações inflamatórias com ativação de várias outras células do sistema imunológico.

1.2.2 - Hipersensibilidade

A hipersensibilidade pode ser definida como uma resposta imunológica de forma inadequada ou exagerada, produzindo uma lesão tecidual (ROIT *et al.*, 1989). Ela começou a ser estudada no início do século, quando se notou que o segundo contato de um organismo com um agente tóxico ou infeccioso podia levar a um estado de resistência, bem como a uma sensibilidade ao agente indutor. As reações de hipersensibilidade nos indivíduos são apenas expressões das respostas imunológicas benéficas, manifestando-se de modo inadequado ao seu aparente estado de agressão.

GELL & COOMBS (1968) descreveram 04 (quatro) tipos de hipersensibilidades, acrescidos posteriormente de um 5º tipo, segundo ROIT (1983), denominadas reações do tipo I, II, III, IV e V. As reações dos tipos I, II, III e V são as descritas como hipersensibilidade imediata, ou seja, ocorre em um curto espaço de tempo decorrido entre o contato com o antígeno e o aparecimento da reação. A semelhança entre estes 04 (quatro) tipos de hipersensibilidades tem como base o fato de serem induzidas pelo complexo antígeno - anticorpo. Assim, a hipersensibilidade imediata pode ser transferida para indivíduos não sensibilizados através da transferência de anticorpos ou células produtoras de anticorpos. A hiper-

sensibilidade do tipo IV não pode ser transferida através do soro, pois ela é mediada por células, os linfócitos T, e não por anticorpos. Embora os linfócitos T sejam um instrumento para produzir reações do tipo retardada, eles agem geralmente recrutando outros tipos de células para o local da reação.

A hipersensibilidade do tipo I, também chamada de anafilaxia, é a mais comum, sendo que 10 % da população mundial é atingida por algum tipo de reação de hipersensibilidade.

1.2.3 - Anafilaxia

O termo anafilaxia (ana = contra, filaxis = proteção) foi proposto por RICHET & PORTIER (1902) para um fenômeno observado em cães imunizados com um extrato tóxico de anêmonas marinhas. Eles verificaram que, uma primeira dose do extrato ao invés de conferir proteção ao animal, tornava-o extremamente reativo a uma nova dose.

A reação anafilática é o resultado da interação de um antígeno com anticorpos fixos nas membranas de células. Estas células correspondem aos mastócitos nos tecidos e aos basófilos no sangue periférico. Ligações cruzadas entre duas moléculas de anticorpos adjacentes, estabelecidas por moléculas de antígeno, levam à desgranulação destas células (FIGURA 02). Portanto, apenas antígenos polivalentes são capazes de causar uma reação anafilática. A desgranulação de mastócitos ou basófilos leva à liberação de mediadores que são substâncias vasoativas, como serotonina e histamina, bem como fatores quimiotáticos para eosinófilos ou neutrófilos, ativadores de plaquetas, etc.

A anafilaxia pode ser sistêmica ou local, dependendo da via de introdução do antígeno. Uma anafilaxia sistêmica ocorre quando o antígeno é introduzido por via intravenosa e caracteriza-se principalmente por apresentar distúrbios respiratórios, causados pela vasoconstrição,

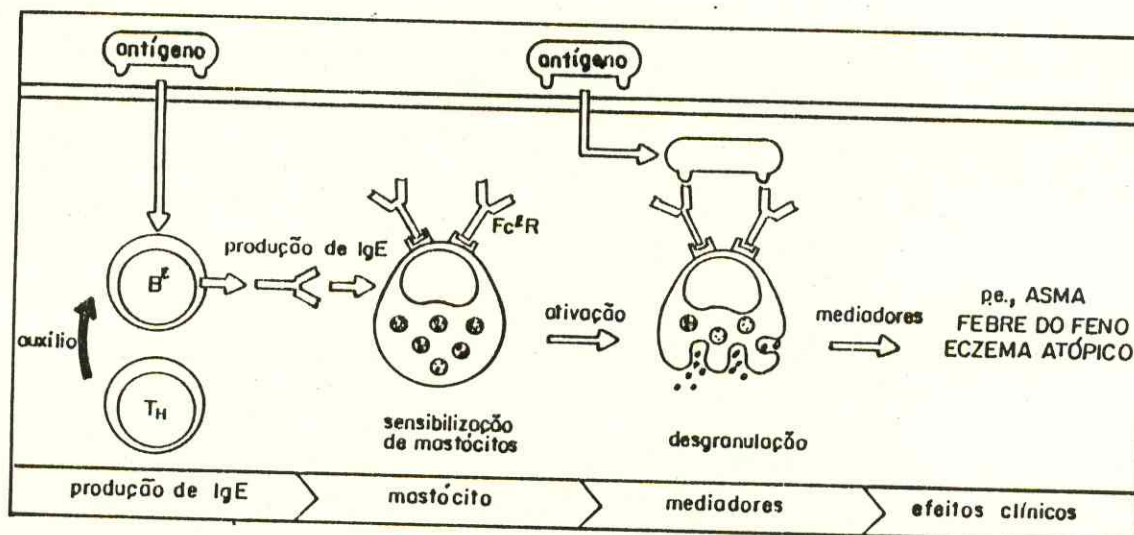


FIGURA 02 - Esquema global para a hipersensibilidade do tipo I. Os linfócitos B são estimulados por um antígeno específico a produzirem IgE, com o auxílio dos linfócitos T. Posteriormente, a IgE produzida liga-se a receptores específicos para a sua porção Fc ($Fc^{\epsilon}R$) na superfície de mastócitos, sensibilizando-os. Um novo contato com o antígeno, favorecerá a ligação cruzada deste com as IgEs específicas localizadas na membrana do mastócito. Estas ligações cruzadas ativam o mastócito, levando-o a desgranulação com liberação de mediadores que caracterizam a hipersensibilidade do tipo I (ROIT *et al.*, 1988).

erupções na pele, edemas e colapso vascular. Quando o antígeno é aplicado na pele, tem-se a anafilaxia local, com o aparecimento de urticárias.

Os anticorpos anafiláticos podem ser transferidos para um indivíduo normal através da transferência do soro, sendo este processo chamado anafilaxia passiva. Quando a transferência é feita através da pele, tem-se a anafilaxia cutânea passiva (PCA). Esta propriedade de transferir anticorpos anafiláticos através da pele de animais, foi posteriormente transformada em técnica de quantificação de anticorpos do tipo IgE e sistematizada por OVARY (1952). Existem duas classes de anticorpos anafiláticos: a classe de imunoglobulinas E (IgE) e uma subclasse de imunoglobulinas G, a gama-1 (IgG₁) (PROUVOST-DANON *et al.*, 1972). Estes anticorpos são denominados de homocitotrópicos, ou seja, sensibilizam apenas a espécie animal que lhes deu origem. Contudo, está comprovado que a IgE de camundongos é heterocitotrópica, uma vez que consegue sensibilizar mastócitos de rato (PROUVOST-DANON *et al.*, 1975).

1.2.4 - Regulação da Síntese de Anticorpos Anafiláticos

Os fatores que provavelmente melhor influenciam o desenvolvimento de anticorpos anafiláticos, são os fatores genéticos. Parece haver um "locus" regulador que influencia a produção de IgE através de um mecanismo mediado por linfócitos T (TIZARD, 1984). O desenvolvimento da alergia parece depender de uma interação entre o gene regulador de IgE e um ou mais genes da resposta imunológica localizado dentro da região do complexo principal de histocompatibilidade (HLA).

Os linfócitos T desempenham um papel determinante no que diz respeito ao isótipo da imunoglobulina a ser produzido por uma imunização específica. Estas células exercem a maioria das suas funções através da liberação de fatores solúveis conhecidos como linfocinas. Foi mostrado que uma

linfocina chamada BSF-1 ("B cell stimulatory factor-1") aumenta a resposta dos tipos IgE e IgG₁ em linfócitos B ativados por lipopolissacarídeo e que esta atividade era totalmente inibida por pequenas quantidades de δ -interferon (COOFMAN et al., 1986). Posteriormente, SNAPPER et al., (1988) chamaram o BSF-1 de interleucina-IV (IL-IV) e demonstraram que ela regula de maneira diferente a produção de IgE e IgG₁. Foi demonstrada também a capacidade que tinham os anticorpos anti-IL-IV e anti- δ -interferon de inibirem a produção de anticorpos dos tipos IgE e IgG₁, evidenciando assim a importância das linfocinas na regulação da expressão das classes de imunoglobulinas. Foi ainda estabelecido que é necessária uma outra linfocina, além da IL-IV para a produção de IgE, mas não de IgG₁ (FINKELMAN et al., 1989).

Um fator que influencia na produção de anticorpos de uma forma geral, é a presença do adjuvante. Adjuvantes são substâncias que intensificam a resposta imunológica de forma bastante complexa. Ele age sobre o antígeno, aprisionando-o no local de aplicação, de forma que o antígeno seja liberado aos poucos, por um tempo mais prolongado. O adjuvante também estimula a migração de células inespecíficas ao local de aplicação do antígeno, aumentando a probabilidade de interação entre o antígeno e estas células (CALICH & VAZ, 1988). Os adjuvantes são muitas vezes, específicos para a produção de um determinado anticorpo. Células de Bordetella pertussis exercem um efeito adjuvante na produção de anticorpos em homens e animais, estimulando principalmente a produção de IgE e IgG₁ (MUNOZ & BERGMAN, 1977). O componente presente nestas células que mais estimula a produção destes anticorpos é uma substância chamada pertussigênio. No entanto, o adjuvante completo de FREUND estimula a produção de IgG, mais induz a proliferação de linfócitos T supressores específicos para IgE (HIRASHIMA et al., 1981a). O gel de alumínio (Al(OH)₃) estimula populações de linfócitos T auxiliares e/ou fatores regulatórios para IgE (UEDE & ISHIZAKA, 1982) tal como ocorre com o Nippostrongylus brasiliensis (YODOI et al., 1980).

O mecanismo da regulação específica da síntese de IgE foi estudado em ratos. Verificou-se que linfócitos T de nódulos linfáticos mesentéricos liberam fatores solúveis que ligam IgE. Destes fatores, foram identificados 02(dois) que regulam a síntese de IgE, suprimindo-a ou potenciando-a (HIRASHIMA *et al.*, 1980; SUEMURA *et al.*, 1980). Ambos fatores são glicoproteínas, sendo que o fator potenciador da síntese de IgE possui oligossacarídeos "N-linked" e "O-linked" e o fator supressor da síntese de IgE possui apenas oligossacarídeos "O-linked" (YODOI *et al.*, 1982). Evidências experimentais têm mostrado que ambos os fatores, potenciador e supressor, compartilham de um gene estrutural comum, sendo que um processo de glicosilação pós-translacional, decide o fator a ser formado (MARTENS *et al.*, 1985).

A formação do fator potenciador ou supressor é regulada por outros 02(dois) fatores, também liberados por linfócitos T, o GEF ("glycosylation enhancing factor") e o GIF ("glycosylation inhibitory factor"), respectivamente (HIRASHIMA *et al.*, 1981a; HIRASHIMA *et al.*, 1981b). O GEF é uma protease semelhante à calicreína (IWATA *et al.*, 1983) e o GIF é uma lipomodulina fosforilada (UEDE *et al.*, 1983). O GEF aumenta a glicosilação do peptídeo precursor por oligossacarídeo "N-linked" e o GIF inibe este tipo de glicosilação (UEDE & ISHIZACA, 1982). Portanto, a presença de oligossacarídeos "N-linked" parece ser determinante na formação do fator potenciador de IgE.

O homem parece apresentar fatores regulatórios da síntese de anticorpos anafiláticos semelhantes aos encontrados nos ratos. Foram identificados no homem o EFA (Enhancing factor of allergy") e o SFA ("Supressive factor of allergy") que apresentam homologias funcionais para o GEF e GIF, respectivamente. O EFA e o SFA do homem apresentam algumas diferenças ao serem comparados com os fatores regulatórios dos ratos, como por exemplo o fato da célula alvo para o EFA pertencer a uma subpopulação de linfócitos T Lyt 2+ e a célula alvo para o GEF pertencer a subpopulação de linfócitos T Lyt 1+. No caso do SFA, ele é produzido pela subpopulação de linfócitos T Lyt 1+, onde o GIF é pro-

duzido pela subpopulação de linfócitos T Lyt 2+ (KATZ, 1980).

A regulação da síntese de IgE é, de longe, a mais estudada, quando comparada a da síntese de IgG₁. Ela parece ser exercida, nos animais e no homem, por uma variedade de fatores solúveis produzidos por células do sistema imunológico e estes fatores agem através de mecanismos bastantes complexos.

1.3 - Objetivo

O feijão mangalô (Lablab purpureus), no qual já foram detectadas lectinas, é largamente utilizado como alimento em países como a Índia e Turquia. No Brasil, ele é consumido ao norte do estado da Bahia, onde é referida pela população, uma sensação de plenitude pós-prandial após o consumo. O objetivo do presente trabalho é uma análise apurada da atividade hemaglutinante das proteínas extraídas do Lablab purpureus com PBS, bem como uma avaliação da imunogenicidade destas proteínas, através da quantificação de anticorpos dos tipos IgG₁ e IgE. Será estudado o possível efeito imunomodulador exercido pela lectina, cuja presença é presumida pela atividade hemaglutinante.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Animais

Camundongos "swiss" com idades entre 7 a 10 semanas provenientes de pequena colônia mantida no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC-Fortaleza-Ce) foram utilizados. Esta colônia teve início com animais enviados do Conhaugh Laboratories Limited (Ontário-Canadá) para os laboratórios Alfa Connlab do Brasil S.A. (Fortaleza-Ce).

Foram usados também ratos albinos, machos, adultos, pesando entre 300 e 400 g e mantidos em colônia fechada no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

2.2 - Vegetal

Foram utilizadas sementes do feijão mangalô colhidas na cidade Riacho da Guia no estado da Bahia que, segundo informação do Instituto de Botânica da Universidade Federal da Bahia, não são nativas da região. A classificação botânica foi inicialmente feita pelo professor Afrânio Fernandes do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (Fortaleza-Ce), sendo as sementes reconhecidas como Dolichos lablab (L.) e após consulta ao "Royal Botanic Gardens" (Kew-England), ficou conhecida através do Dr. G.P. Lewis a classificação atual. O Dolichos lablab foi reclassificado por SWEET, sendo atualmente denominado Lablab purpureus (L.) Sweet. Contudo, não foi possível a identificação da variedade do Lablab purpureus (L.) Sweet usado no presente trabalho.

FARINHA: obtida das sementes quiescentes de Lablab

purpureus, isentas de tegumentos. As sementes foram trituras em um gral e moídas em moinho BRAUN, sendo a farinha obtida, acondicionada em frascos fechados e mantida a 4°C.

EXTRATO TOTAL (ET): obtido de acordo com a FIGURA 03.

Foi adicionado à farinha de Lablab purpureus, tampão fosfato de potássio 0,025 M contendo NaCl 0,15 M, pH 7,4 (PBS), na proporção de 1:10 (p:v). A farinha permaneceu em contato com o PBS por 04(quatro) horas, sob agitação a 4°C. A mistura foi centrifugada por 20 minutos, a 2000 g em centrífuga Sorval, rotor SS-34. O resíduo foi desprezado e o sobrenadante, o qual foi denominado de Extrato Total (ET), filtrado em papel-filtro qualitativo. Foi retirada uma alíquota para determinação do conteúdo protéico (item 2.5) e da atividade hemaglutinante (item 2.6). O sobrenadante foi então dialisado exaustivamente contra água e liofilizado. Fez-se então a determinação de proteína(item 2.5) e da atividade hemaglutinante (item 2.6) do liofilizado.

FRAÇÕES F0-50 %, F50-70 % e F70-90 % obtidas do ET por precipitação salina com sulfato de amônio como é mostrado na FIGURA 03.

Adicionou-se ao Extrato Total, sulfato de amônio em quantidades necessárias à obtenção dos níveis de saturação 0-50 %, 50-70 % e 70-90 %. O material permaneceu em contato com o sal por 24 horas, sob agitação a 4°C e foi então centrifugado a 2000 g por 20 minutos. Os precipitados foram dissolvidos em PBS e dialisados contra o mesmo tampão. Foram feitas determinações do teor protéico (item 2.5) e da atividade hemaglutinante (item 2.6). As frações foram então dialisadas contra água e liofilizadas, sendo novamente feitas a determinação, de proteínas e da atividade hemaglutinante.

FRAÇÕES F0-30 %, F30-40 % e F40-50 % obtidas do ET por precipitação salina com sulfato de amônio.

Empregou-se neste fracionamento a mesma metodologia descrita anteriormente e foram determinadas as atividades hemaglutinantes (item 2.6), bem como o teor de proteína (item 2.5) em cada fração.

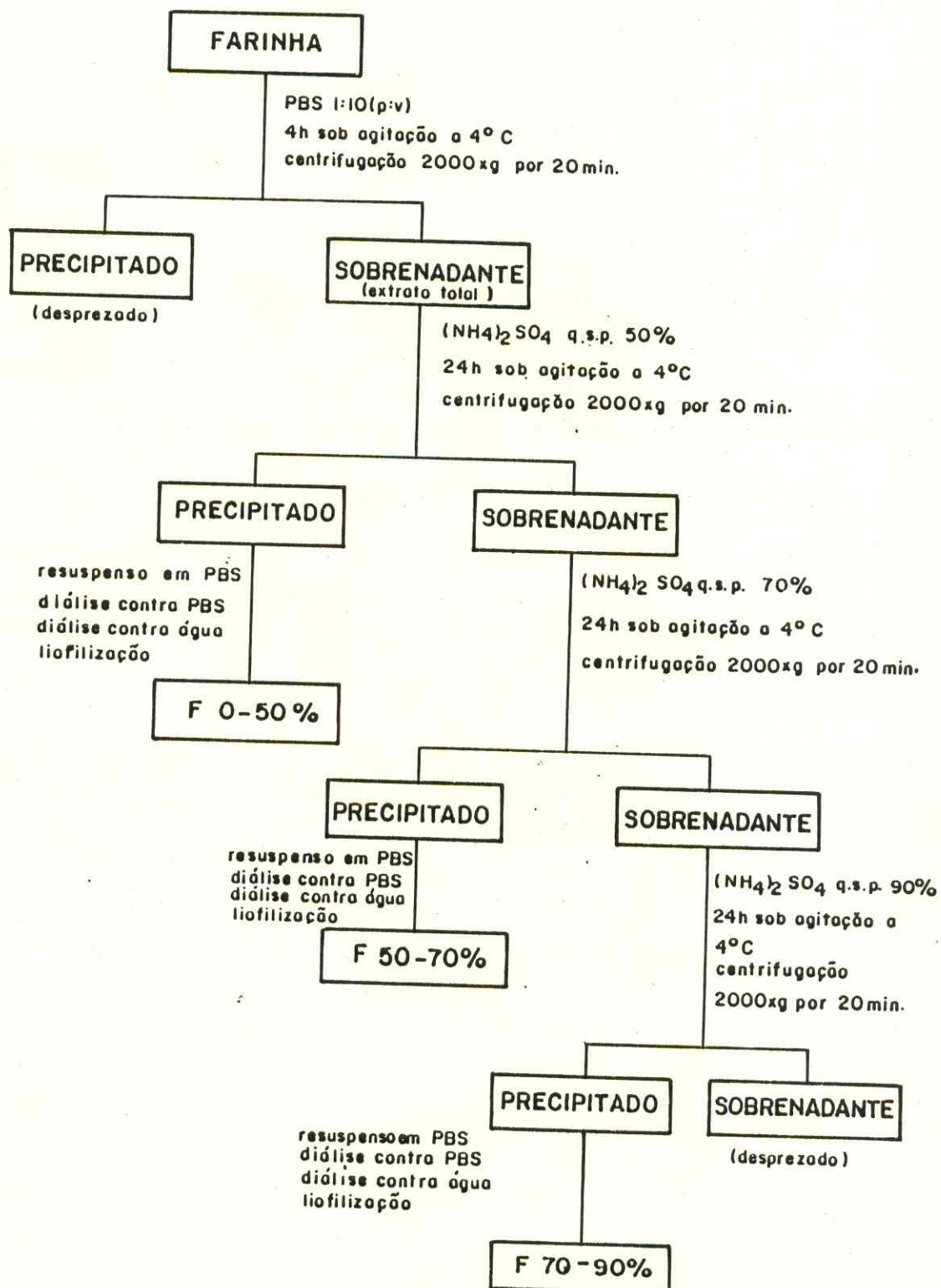


FIGURA 03 - Fracionamento do extrato total por precipitação com sulfato de amônio.

2.3 - Adjuvante

O gel de hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) foi utilizado como adjuvante nas imunizações e preparado de acordo com PROUVOST-DANON et al. (1966), cuja descrição é dada a seguir: 15 g de sulfato de amônio e alumínio ($\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) foram dissolvidos em 180 ml de água destilada. A esta solução foi acrescentado, gota a gota, 75 ml de NaOH 1 N e a solução deixada em repouso por 24 horas para que houvesse a formação de um precipitado ($\text{Al}(\text{OH})_3$). O precipitado foi lavado com água destilada por 05 (cinco) vezes, seguidas de centrifugação (Centrífuga Sorval, rotor SS-34) a 2000 g durante 20 (vinte) minutos. O precipitado foi então suspenso em 15 ml de água destilada, obtendo-se um gel espesso pipetável e sem grumos.

Alíquotas de 1 ml da suspensão foram colocadas em estufa a 100°C durante 24 horas e determinado o peso seco. O volume do gel foi então ajustado com água de modo a ter 60 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$ /ml.

2.4 - Reagentes

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

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

Sephadex G-100 fina - Pharmacia Fine Chemicals, Suécia.

Acrilamida e N-N'Metilenobisacrilamida - Eastman Organic Chemical, Rochester, N.Y., USA.

Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) - E. Merck Ag., Darmstadt, Alemanha.

β -Mercaptoetanol - E. Merck, Darmstadt, Alemanha.

EDTA - E. Merck, Darmstadt, Alemanha.

Sulfato de Amônio e Alumínio ($\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) - Mallinckrodt, St Louis, USA.

Ovalbumina 5x cristalizada (90 %) - Serva,

Heidelberg, Alemanha Ocidental.

Os demais reagentes são de grau analítico e foram adquiridos comercialmente.

2.5 - Determinação da Proteína

Foram feitas determinações de proteína do ET e das frações através do método do microbiureto, segundo GOA(1953), utilizando-se a albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Para os eluatos de colunas, as determinações de proteínas foram feitas segundo o método descrito por BRADFORD (1976), utilizando-se também BSA como padrão.

2.6 - Determinação da Atividade Hemaglutinante

O método usado para determinar a atividade hemaglutinante das frações protéicas e eluatos de colunas 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). No presente trabalho foram usadas também hemácias de camundongo, de cobaia, humanas e de carneiro.

As amostras foram diluídas de maneira seriada em tubos contendo NaCl 0,15 M, de forma que o volume final em cada diluição fosse 100 μl . Em seguida, foram adicionados a cada tubo 100 μl de uma suspensão de hemácias a 4 %, de diferentes animais. Em alguns ensaios, foram adicionados nos tubos, íons Ca^{2+} e Mn^{2+} de forma que a concentração final em cada tubo fosse igual a 1,25 mM. Os tubos foram incubados em estufa a 37°C, por 30(trinta) minutos e deixados a temperatura ambiente por mais 30(trinta) minutos. A detecção da aglutinação das hemácias foi feita em um microscópio e quantificada em unidades de hemaglutinação (UH). Uma UH é a quantidade de amostra do material por ml em um tubo de ensaio dando uma forte reação de 2+, isto é, 50 % de hemagluti-

nação (PUSZTAI et al., 1987).

2.7 - Ensaio com EDTA

A fração F0-50 % foi dissolvida em PBS-EDTA 0,01 M e dialisada contra a mesma solução. Em seguida, foi feita a determinação da atividade hemaglutinante do dialisado, na presença e na ausência dos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} 1,25 mM.

2.8 - Inibição da Atividade Hemaglutinante por Açúcares

Partindo-se de uma solução-estoque 0,2 M de cada açúcar, foram feitas diluições seriadas num intervalo de 0,05 a 0,0015 M, sendo mantido um volume de 50 μl . Adicionava-se a seguir, 50 μl do ET numa concentração previamente determinada como sendo a menor concentração ainda capaz de induzir 100 % de hemaglutinação. Adicionava-se então 100 μl de uma suspensão de hemácias de coelho a 4 %. Os tubos foram colocados em estufa a 37°C, por 30 (trinta) minutos e posteriormente deixados à temperatura ambiente por mais 30 (trinta) minutos. As hemácias foram então observadas em microscópio, sendo a menor concentração do açúcar capaz de inibir 50 % da reação referida como I_{50} %.

2.9 - Cromatografia em Sephadex G-100

Usou-se uma coluna de Sephadex G-100, medindo 19,5 cm de altura e 1,3 cm de diâmetro, preparada e montada segundo DETERMAN (1969). O gel foi entumescido em água durante pelo menos 72 horas e a coluna montada deixando-se o gel sedimentar por ação da gravidade. A coluna foi então equilibrada com PBS e a amostra (F0-50 %) foi dissolvida no

tampão de equilíbrio e eluída com o mesmo tampão, a um fluxo de 39 ml/h. Em seguida, a coluna foi lavada com PBS contendo glicose 0,2 N. A leitura de absorbância (280 nm) dos efluentes foi realizada em um espectrofotômetro VARIANT-634 e foram recolhidas alíquotas dos picos para determinação da Atividade Hemaglutinante Específica (AHE), de acordo com a fórmula abaixo:

$$AHE = \frac{\text{nº de UH}}{\text{mg de proteína}}$$

Uma outra coluna, de Sephadex G-100 foi montada com maiores dimensões (diâmetro = 2,5 cm e altura = 30,5 cm), seguindo a mesma metodologia usada anteriormente. A coluna foi equilibrada com PBS e as amostras (ET e F30-40 %) dissolvidas no tampão de equilíbrio foram eluídas com o mesmo tampão. As eluições foram feitas a um fluxo de 58,8 ml/h. Como no experimento anterior, a coluna foi lavada com PBS contendo glicose 0,2 N ou tampão glicina/HCl 0,1 N pH 2,7, na expectativa da liberação de alguma proteína que tivesse ficado retida na coluna. A cromatografia foi acompanhada pelas leituras de absorbância (280 nm) dos efluentes em espectrofotômetro VARIAN-634. De cada fração recolhida, foi determinada a AHE.

2.10 - Cromatografia em Coluna de Manose Acoplada a Epoxi-Sepharose-6B Ativada

Uma coluna de manose acoplada a epoxi-Sepharose-6B ativada, foi preparada seguindo instruções do fabricante.

A coluna, cujo diâmetro era igual a 1,3 cm e possuía altura igual a 4,1 cm, foi equilibrada com PBS, sendo a amostra (F0-50 %) dissolvida no tampão de equilíbrio e aplicada na coluna. Em seguida, fez-se a eluição com PBS, seguida de PBS contendo glicose 0,2 N. As frações foram recolhidas em um coletor automático Fraccil-100 e foram fei-

tas leituras de absorvância (280 nm) dos efluentes em um espectrofotômetro VARIAN-634.

2.11 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS e β -mercaptoetanol em Placas

Foram usadas neste experimento, amostras do ET, bem como das frações F0-50 %, F50-70 % e F70-90 % dialisadas e liofilizadas, dissolvidas em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0, contendo SDS e β -mercaptoetanol 1 %. As amostras foram incubadas a 100°C por 20(vinte) minutos e então submetidas a uma eletroforese descontínua, descrita por LAEMMLI (1970) e adaptada para o uso de placas. Foram usadas também como amostras, as frações F0-50 % e F70-90 % sem adição do β -mercaptoetanol 1 %.

As placas foram preparadas usando-se 02(dois) tipos de geis: o gel de aplicação, composto por acrilamida 4 % e 0,1 % de SDS em tampão tris-HCl pH 6,8 e o gel de separação, contendo 17,6 % de poliacrilamida e 0,1 % de SDS em tampão tris-HCl pH 8,8.

Foram aplicadas alíquotas das amostras acrescidas de um corante (azul de bromofenol 0,05 %) para visualizar a frente de corrida, em poços preparados no gel de aplicação. As amostras foram submetidas a uma corrente contínua de 30 mA e tampão tris-glicina 0,04 M pH 8,3. O gel foi corado durante pelo menos 20(vinte) horas com Coomassie Brilliant Blue 0,005 % em metanol: ácido acético: água(4:0,7:3,3) e o descoramento foi feito com uma solução de ácido acético: metanol: água (1:8:3,3).

Os pesos moleculares foram calculados usando-se como padrão a lectina conA que se dissociou em 04(quatro) subunidades cujos pesos moleculares são 26.000, 14.000, 12.000 e 9.000 daltons.

2.12 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS em Tubos

As amostras (pico I e pico II de proteína obtidos da F30-40 % através de cromatografia em Sephadex G-100) liofilizadas foram dissolvidas em tampão fosfato 0,01 M com SDS 2 % e submetidas a uma eletroforese em tubos, segundo técnica descrita por WEBER & OSBORN (1969).

Os tubos foram preparados usando-se gel composto de tampão fosfato 0,1 M, com SDS 0,1 % e acrilamida 5 %.

Foi adicionado às amostras um corante (azul de bromofenol a 1 %) para visualizar a frente de corrida eletroforética. Em seguida, as amostras foram adicionadas nos topos dos tubos e submetidas a uma corrente de 7mA/tubo durante 04 (quatro) horas usando-se uma corrente contínua e tampão fosfato 0,1 M com SDS 0,1 %.

O gel foi corado por pelo menos 20 (vinte) horas com o Coomassie Brilliant Blue 0,05 % em metanol: ácido acético: água e descorados por uma solução de metanol: ácido acético: água (1:1,5:17,5).

Os pesos moleculares foram calculados a partir do método descrito por XAVIER & MOREIRA (1978).

2.13 - Imunização por Via Subcutânea

Grupos de 08(oito) camundongos do tipo "swiss" foram imunizados por via subcutânea, na região dorsal, com diferentes antígenos (proteínas). Para cada animal foram injetados 0,5 ml de uma solução salina contendo 100 µg do antígeno acompanhado ou não do adjuvante de acordo com o esquema experimental (item 2.11). Foram dados reforços nas mesmas condições, nos dias 21 e 35 após a imunização inicial.

2.14 - Obtenção de Antissoros

As amostras de sangue foram coletadas com o auxílio de uma pipeta Pasteur, no plexo orbital dos camundongos em diferentes dias (item 2.16). O sangue foi deixado em repouso por 01(uma) hora a temperatura ambiente para que houvesse retração do coágulo. Os "pools" de soro foram colhidos com pipeta Pasteur e então centrifugados (International Clinical Centrifuge CL4487-7) a 2500 rpm, por 05(cinco) minutos para retirar algumas hemácias que não se prenderam ao coágulo. Os "pools" de soro foram então armazenados em recipientes de plástico e guardados a -20°C .

2.15 - Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA)

Os anticorpos do tipo IgE presentes em soros de camundongos imunizados foram quantificados através da técnica de PCA em ratos como descrito por OVARY (1952) e modificado por MOTA & WONG (1959). Os anticorpos do tipo IgG₁ também foram quantificados através da Anafilaxia Cutânea Passiva, sendo a técnica adaptada para o uso de camundongos.

O título de PCA foi definido como o logaritmo na base dois do inverso da diluição máxima do antissoro (D_{max}) capaz de provocar uma reação cutânea positiva.

$$\text{Título de PCA} = \log_2 1/D_{\text{max}}$$

2.15.1 - Reações de Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA) para IgG₁ em Camundongos

As respostas do tipo IgG₁ foram determinadas através de reações de PCA em camundongos "swiss". A pele da região dorsal do animal foi raspada e diluições seriadas dos antissoros, em volume de 50 μl , foram injetadas intradermi-

camente em pontos previamente marcados. Após 02(duas) horas da injeção dos antissoros, foi aplicado por via endovenosa, no plexo orbital do animal, uma solução contendo 500 μg do antígeno específico dissolvido em 250 μl de azul de Evans 0,5 %. Os animais foram sacrificados 30(trinta) minutos após a aplicação do antígeno e a pele foi dissecada para análise da resposta. A resposta foi avaliada pelo aparecimento na pele do animal de uma mancha azulada provocada pelo extravasamento do corante. As PCAs foram feitas com animais em duplicatas. Foram usadas como controles, solução salina e soro de camundongos colhidos no dia "zero", ou seja, no dia inicial da imunização.

2.15.2 - Reações de Anafilaxia Cutânea Passiva (PCA) para IgE em Ratos

Para se determinar títulos de anticorpos do tipo IgE em soro de camundongos, foram feitas PCAs em ratos albinos. A pele da região dorsal do animal foi raspada e as diluições dos antissoros, em volumes de 100 μl , aplicadas em pontos determinados anteriormente. Após um período de latência de 22 horas foram injetadas endovenosamente, na veia peniana do animal, 100 μl de uma solução de azul de Evans 0,5 % contendo 2000 μg do antígeno específico. Após 30(trinta) minutos do desencadeamento da reação de PCA, o animal foi sacrificado e a pele dissecada para análise do resultado. As PCAs foram feitas com animal em duplicatas e foram usados como controles solução salina e soro dos camundongos colhido no dia da imunização inicial.

2.16 - Esquema Experimental

Grupos de 08(oito) camundongos "swiss" foram imunizados por via subcutânea com diferentes frações protéicas,

como descrito no esquema a seguir:

A - Grupos do Extrato Total (ET).

A.1 - Camundongos imunizados com 100 μg do ET + 1 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$.

A.2 - Camundongos imunizados com 100 μg do ET.

B - Grupos das frações protéicas do ET.

B.1 - Camundongos imunizados com 100 μg da fração F0-50 % + 1 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$.

B.2 - Camundongos imunizados com 100 μg da fração F-50-70 % + 1 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$.

B.3 - Camundongos imunizados com 100 μg da fração F-70-90 % + 1 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$.

C - Grupos da Ovalbumina (OVA)

C.1 - Camundongos imunizados com 100 μg de OVA + 1 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$.

C.2 - Camundongos com 100 μg de OVA.

Todos os animais foram sangrados no dia "zero" ou seja, no dia da imunização inicial, como controle. Foram também sangrados nos dias 7, 14, 21 após a imunização inicial, para averiguação da resposta primária. Nos dias 21 e 35 foram dados reforços nas mesmas condições da imunização inicial e foram feitas sangrias nos dias 28, 35 e 42 para obtenção da resposta secundária.

2.17 - Análise Estatística

Foi feita uma análise de variância entre os títulos de IgG_1 e IgE obtidos pelas imunizações com 100 μg de ET + 1 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$, 100 μg de OVA + 1 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$, 100 μg de ET e 100 μg de OVA. Foram utilizados o modelo fatorial com 2 fatores fixos (antígeno e tempo) com repetições e o teste de Tukey para as comparações individuais. Foi feita também uma análise de variância entre títulos de IgG_1 e IgE obtidos pelas imunizações com 100 μg da fração F0-50 % + 1 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$, 100 μg da fração F50-70 % + 1 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$ e 100 μg da fração F70-90 % + 1 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$.

Foi utilizado o teste de aditividade de Tukey seguido pelo modelo fatorial com 02(dois) fatores fixos (antígeno e tempo) sem repetição. As comparações individuais foram feitas através do teste de Tukey.

Os quadros de análise de variância estão mostrados em anexo.

3 - RESULTADOS

3.1 - Descrição da Semente de Lablab purpureus

O feijão mangalô (Lablab purpureus) apresenta uma vagem pequena, medindo 1,5 cm x 6 cm e contendo 4 a 6 sementes. As sementes possuem tegumentos claros e hilos de cor branca, comprimidos, ocupando aproximadamente 1/3 do perímetro da semente (FIGURA 04). Elas pesam em média 310 mg e medem 7 mm x 11 mm.

3.2 - Teor de Proteína e de Atividade Hemaglutinante nas Frações

A TABELA 01 mostra o teor de proteínas das frações, como também a atividade hemaglutinante presente no extrato total e frações. O extrato total comporta 16,0 UH/mg de proteína. Para as frações, pode ser observado que a maior parte da proteína (33 %) contida no extrato total, como também a atividade hemaglutinante (70 %), precipitaram junto com a fração F0-50 %. A fração F50-70 %, que contém 4,5 % da proteína total, também apresentou atividade hemaglutinante (5 %). Com a fração F70-90 % foi recuperada boa parte da proteína (23 %), mas ela não apresentou atividade hemaglutinante.

Os resultados obtidos quando se fez um fracionamento do ET com sulfato de amônio nos níveis de saturação 0-30 %, 30-40 % e 40-50 %, estão mostrados na TABELA 02. Observa-se que a fração que se apresentou mais purificada foi a fração F30-40 %.

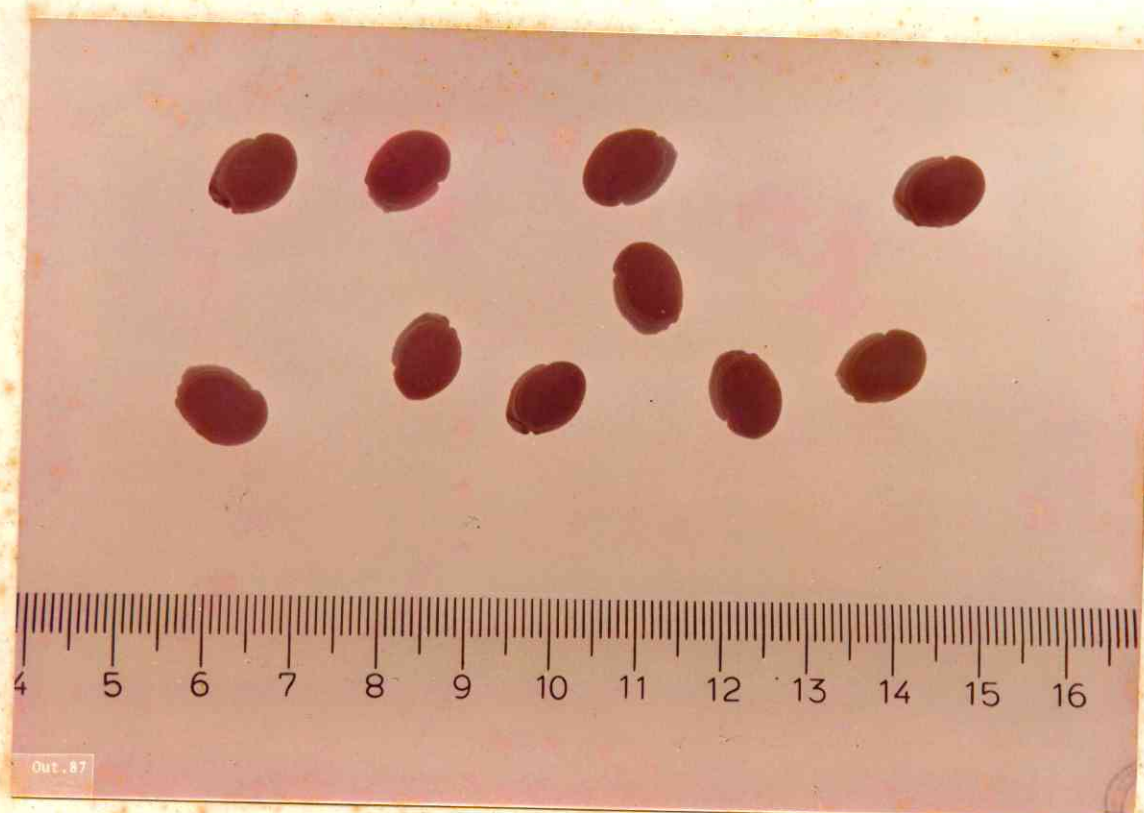


FIGURA 04 - Semente de Lablab purpureus (L.) Sweet.

TABELA 01 - Teor protéico e atividade hemaglutinante do ET e das frações obtidas do ET por precipitação com sulfato de amônio.

Frações	Proteína Total (%)	Unidade de Hemaglutinação UH (μ g/ml) *	Atividade Específica	Atividade Total (UH/g de farinha)	Atividade de Recuperada (%)
ET	100,0	62,50	16,0	2801,66	100
F0-50 %	33,0	31,25	32,0	1888,00	70
F50-70 %	4,5	53,20	18,8	150,30	5
F70-90 %	23,0	0,00	0,0	0,00	0

*Uma UH foi definida como sendo a menor concentração de proteína capaz de causar uma forte reação de 2+ (PUSZTAI et al., 1987).

TABELA 02 - Teor protéico e atividade hemaglutinante das frações F0-30 %, F30-40 % e F40-50 %.

Frações	Proteína Total (%)	Unidade de Hemaglutinação UH (µg/ml) *	Atividade Específica (UH/mg)	Atividade Recuperada (%)
ET	100,00	62,50	16	100,0
F0-30 %	8,46	125,00	8	8,5
F30-40 %	7,00	31,25	32	28,4
F40-50 %	8,76	62,50	16	17,8

*Uma UH foi definida como sendo a menor concentração de proteína capaz de causar uma forte reação de 2+ (PUSZTAI et al., 1987).

3.3 - Atividade Hemaglutinante do Extrato Total em Diferentes Animais

Como pode ser visto na TABELA 03, o extrato total aglutina hemácias de coelho, bem como hemácias humanas. O extrato total não apresentou atividade grupo sanguíneo específica, aglutinando igualmente os sangues do tipo A, B e O. Não foi detectada atividade hemaglutinante para hemácias de camundongos, cobaias e carneiros.

3.4 - Ação dos Íons Ca^{2+} e Mn^{2+} na Atividade Hemaglutinante do Extrato Total

Foi testada a atividade hemaglutinante do extrato total em hemácias de coelho a 2 %, na presença de Ca^{2+} e Mn^{2+} 1,25 mM. Os resultados obtidos não diferiram daqueles obtidos na ausência destes íons (resultados não publicados).

Quando a fração F0-50 % foi dialisada contra PBS contendo EDTA 0,01 M, ela perdeu totalmente a sua atividade hemaglutinante. Mas, a atividade foi recuperada posteriormente pela adição dos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} 1,25 mM (resultados não publicados).

3.5 - Inibição da Atividade Hemaglutinante por Açúcares

O extrato total foi submetido a um ensaio de inibição da atividade hemaglutinante (hemácias de coelho), por vários açúcares, numa faixa de concentração que variava de 0,05 M a 0,0015 M. A TABELA 04 mostra a menor concentração do açúcar capaz de inibir 50 % da atividade hemaglutinante, denominada $I_{50\%}$. De acordo com os resultados, os inibidores mais potentes foram o N-acetil-D-glicosamina ($I_{50\%} = 0,003\text{M}$) e α -metil-D-Manosídeo ($I_{50\%} = 0,003\text{ M}$), seguidos pela D-glicosamina ($I_{50\%} = 0,006\text{ M}$) e D-manose

TABELA 03 - Atividade hemaglutinante do ET em diferentes animais

Origem do sangue	Atividade hemaglutinante
	UH (μ g/ml)
Camundongo	neg [*]
Coelho	62,5
Humano: A	250,0
B	500,0
O	250,0
Cobaia	neg
Carneiro	neg

*Não foi observada aglutinação nem mesmo na maior concentração usada (500 μ g/ml) do ET.

TABELA 04 - Inibição da atividade hemaglutinante do ET por açúcares.

Açúcar	I ₅₀ % (mM) *
N-acetil-D-glicosamina	3,0
α-metil-D-manosídeo	3,0
D-glicosamina	6,0
D-manose	6,0
D-glicose	12,0
N-acetil-D-galactosamina	neg ⁺
Lactose	neg
Melibiose	neg
Rafinose	neg
L-fucose	neg

*Foi considerada a menor concentração requerida do açúcar para inibir 50 % da atividade hemaglutinante do ET.

+Não foi observada inibição da atividade hemaglutinante na maior concentração usada do açúcar referido (50 mM).

($I_{50} \% = 0,006 \text{ M}$). A D-glicose mostrou-se também um bom inibidor da atividade hemaglutinante, sendo o $I_{50} \% = 0,012 \text{ M}$. Os açúcares lactose, melibiose, rafinose e L-fucose não foram capazes de inibir a atividade hemaglutinante do extrato total na maior concentração testada ($0,05 \text{ M}$).

3.6 - Cromatografia em Sephadex G-100

Os resultados obtidos quando o extrato total, recém-extraído com PBS e não dialisado, foi passado em uma coluna Sephadex G-100 e eluído com o mesmo tampão, estão mostrados na FIGURA 05. Houve o aparecimento de 02(dois) picos, ambos com atividade hemaglutinante. O pico I reteve a maior parte da proteína, mas quem apresentou maior Atividade Hemaglutinante Específica (AHE) foi o pico II.

A eluição posterior com PBS contendo glicose $0,2 \text{ N}$ ou a eluição com tampão glicina/HCl $0,1 \text{ M}$, pH $2,7$, não evidenciaram nenhum pico adicional.

O perfil cromatográfico obtido pela fração F30-40 %, dissolvida em PBS e eluída com o mesmo tampão, apresentou 02(dois) picos, ambos com atividade hemaglutinante (FIGURA 06). Pode-se observar que o perfil assemelha-se aquele obtido pelo ET (FIGURA 05), onde o pico I reteve a maior parte da proteína, porém apresentou AHE pequena. O pico II possui baixo teor de proteína, apresentando-se bastante contaminado, inclusive por açúcares (determinado pelo método de DUBOIS (1956), resultados não publicados). Porém a AHE do pico II é bem maior do que aquela apresentada pelo pico I.

Como aconteceu ao ET, nenhum pico foi eluído com PBS contendo glicose $0,2 \text{ N}$ ou com tampão glicina/HCl $0,1 \text{ M}$, pH $2,7$.

Quando a fração F0-50 % foi cromatografada através de uma coluna Sephadex G-100, obteve-se o perfil mostrado na FIGURA 07. A amostra dissolvida em PBS e eluída com o mesmo tampão, apresentou 02(dois) picos de proteína. Não

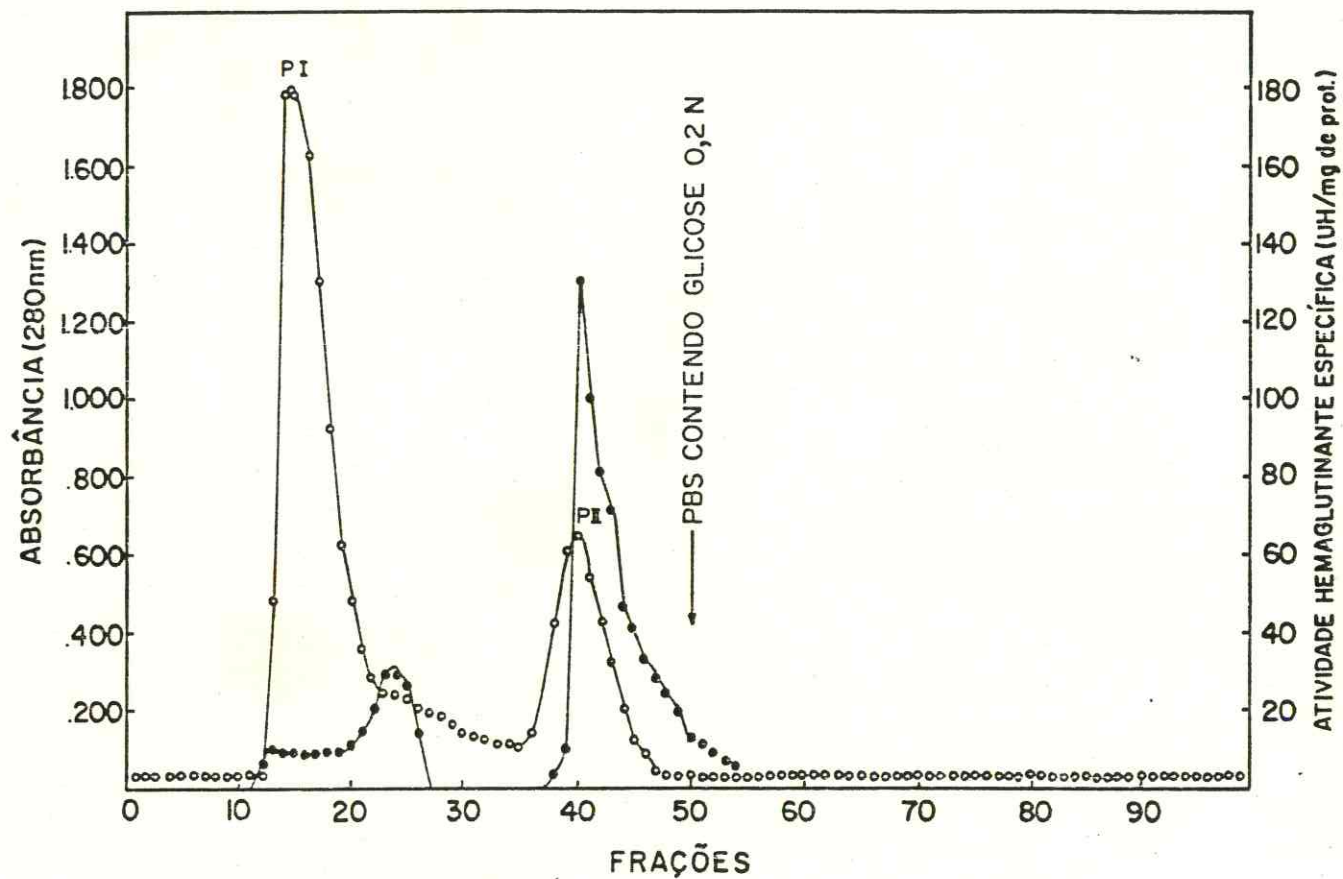


FIGURA 05 - Cromatografia do ET em coluna de Sephadex G-100 equilibrada com PBS e eluída com o mesmo tampão, seguido de PBS contendo glicose 0,2 N.

Amostra: 46 mg/3 ml Fluxo: 58,8 ml/h Frações: 3,9 ml.

○—○ Abs_{280 nm} ●—● UH/mg de proteína.

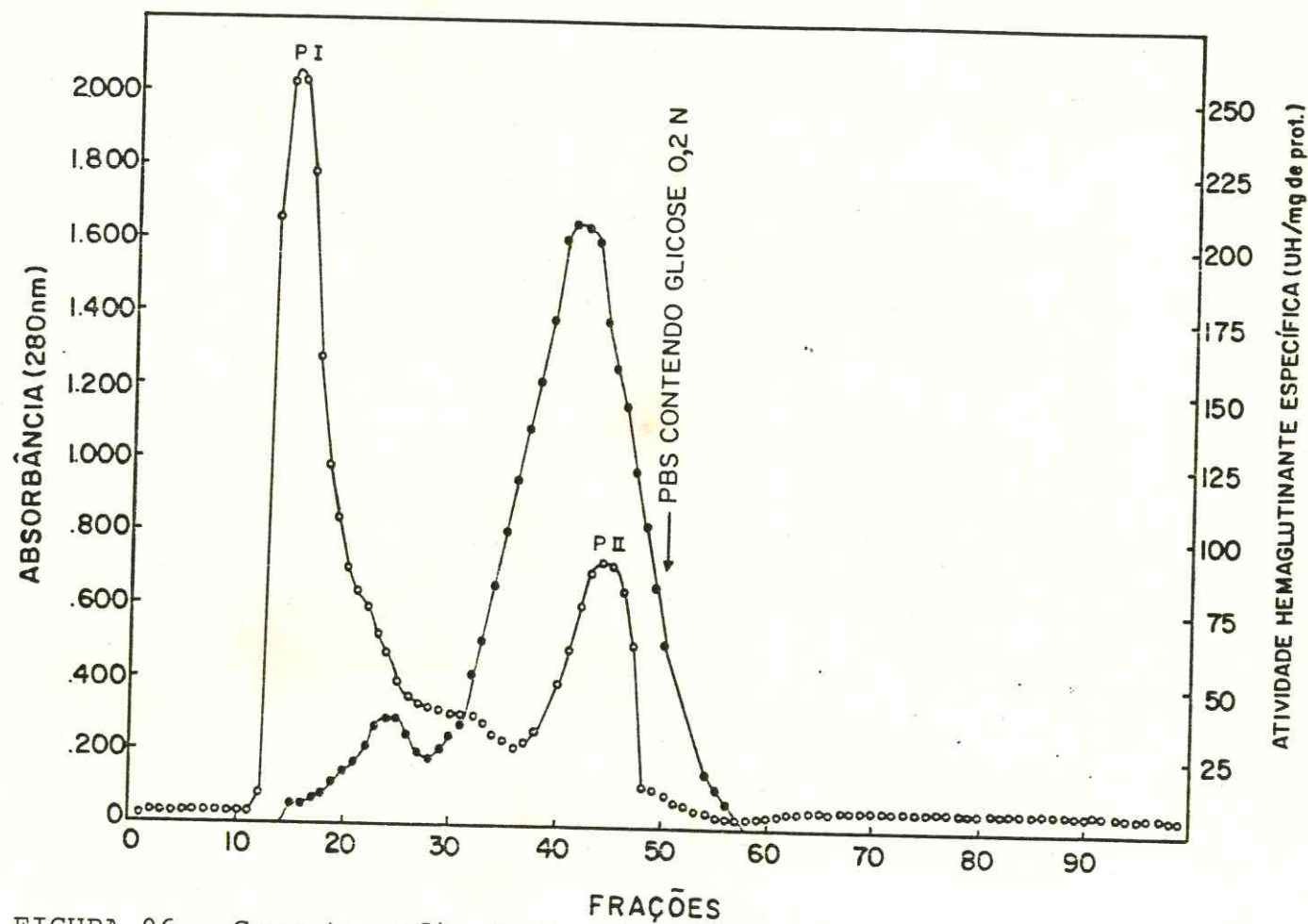


FIGURA 06 - Cromatografia da fração F30-40 % em Sephadex G-100 equilibrada com PBS e eluída com o mesmo tampão, seguido de PBS contendo glicose 0,2 N. Amostra: 100 mg/3ml Fluxo: 58,8 ml/h Frações: 3,9 ml.
 ○ — ○ Abs_{280nm} ● — ● UG/mg de proteína.

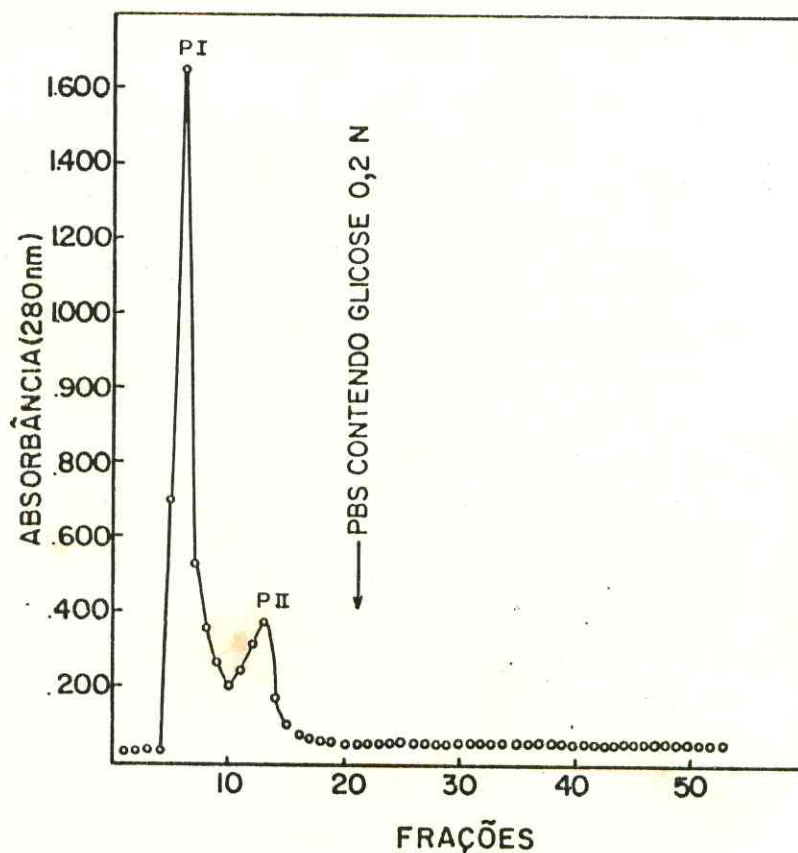


FIGURA 07 - Cromatografia da fração F0-50 % em coluna de Sephadex G-100 equilibrada com PBS e eluída com o mesmo tampão, seguido de PBS contendo glicose 0,2N

Amostra: 10 mg/ml Fluxo: 39 ml/h Frações: 2,6 ml
o—o Abs_{280 nm}

houve aparecimento de outro pico quando foi feita a eluição com PBS contendo glicose 0,2 N. Foram determinadas as AHE dos cumes de ambos picos I e II, sendo que a encontrada no pico II foi maior que aquela encontrada no pico I (resultados não publicados).

3.7 - Cromatografia com Manose Acoplada a Epoxi-Sepharose-6B-Ativada

A coluna de manose acoplada a epoxi-Sepharose-6B-ativada foi utilizada com o intuito de reter a lectina que apresenta especificidade para este açúcar. Mas, com esta cromatografia conseguiu-se obter apenas 01(um) pico que continha atividade hemaglutinante e que foi eluído com o próprio tampão de equilíbrio (FIGURA 08), não havendo nem mesmo peneiramento molecular.

A coluna foi testada com conA, que também apresenta especificidade para manose, e ela se mostrou eficaz em reter toda conA aplicada.

3.8 - Eletroforese

Os padrões eletroforéticos apresentados pelo ET e pelas frações F0-50 %, F50-70 % e F70-90 % estão mostrados na FIGURA 9A. Pode-se observar que as frações apresentam padrões semelhantes. As diferenças fundamentam-se principalmente nas bandas de peso moleculares mais baixos. Observa-se que as bandas de baixo peso molecular estão sobretudo nas frações F0-50 % e F50-70 % sendo muito fraca na fração F70-90 %. Além disto a atividade hemaglutinante só foi detectada nas frações F0-50 % e F50-70 %, inexistindo na F70-90 %.

Na eletroforese em tubos, foram usadas como amostras os picos I e II de proteína, obtidos da fração F30-40 %, através de cromatografia em Sephadex G-100. O pico I

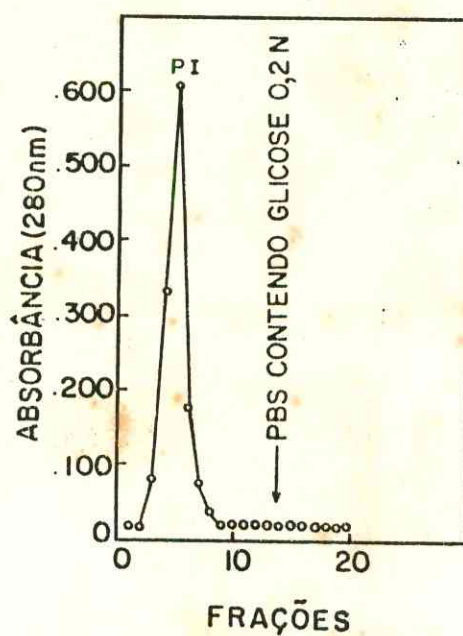


FIGURA 08 - Cromatografia da fração F0-50 % em coluna de manose acoplada a epoxi-Sepharose-6B ativada, equilibrada com PBS e eluída com o mesmo tampão, seguido de PBS contendo glicose 0,2 N.

Amostra: 5 mg/ml Fluxo: 15 ml/h Frações: 2.5 ml

○—○ Abs_{280 nm}

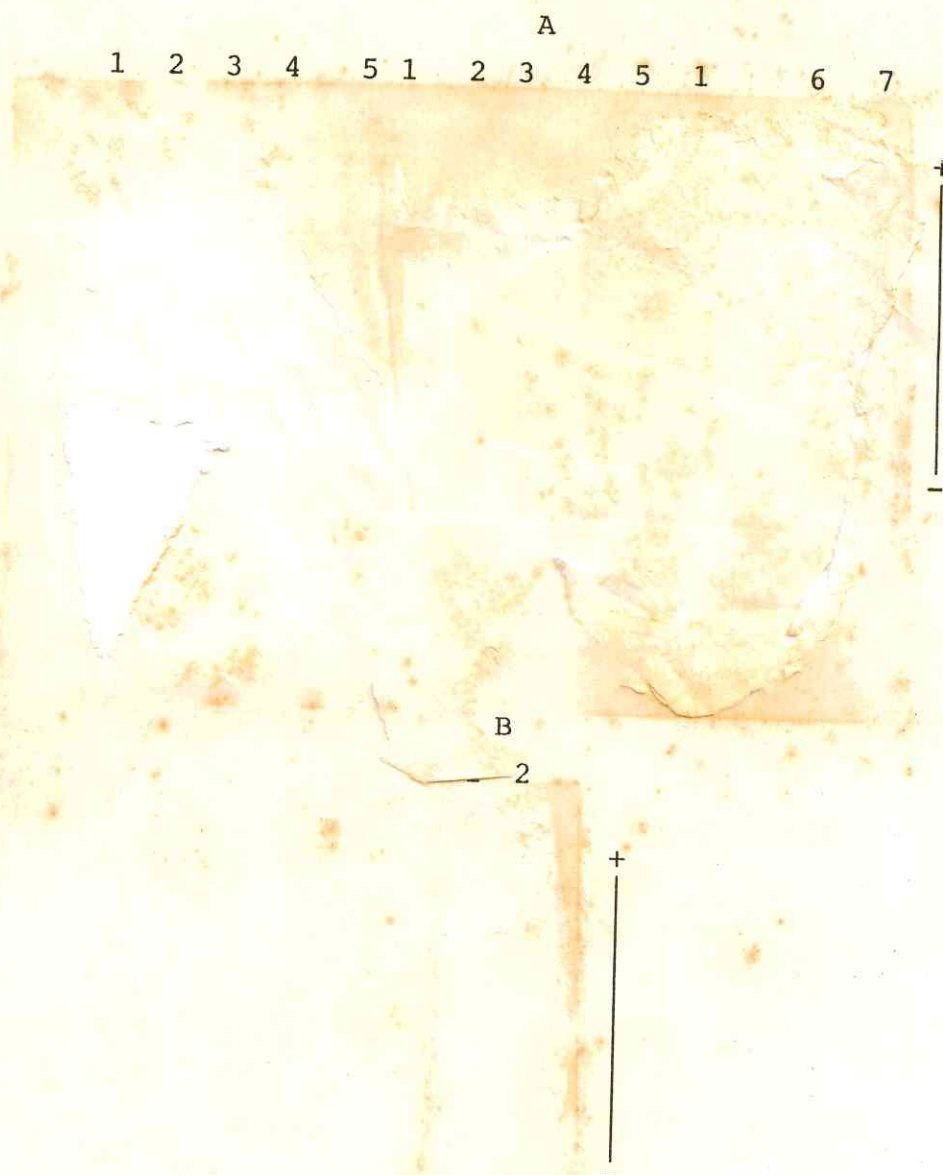


FIGURA 09 - Eletroforese em gel de poliacrilamida. (A) Amostras: 1-conA; 2-F70-90 %; 3-F50-70 %, 4-F0-50 % e 5-ET (todas estas amostras foram tratadas com β -mercaptoetanol 1 %); 5-F0-50 % e 7-F70-90 % (estas amostras não foram tratadas com β -mercaptoetanol 1 %). (B) Amostras: 1-pico I de proteína da F30-40 % obtido através de cromatografia em Sephadex G-100; 2-pico II de proteína da F30-40 % obtido através de cromatografia em Sephadex G-100 (estas amostras não foram tratadas com β -mercaptoetanol 1 %).

apresentou 11 bandas, cujos pesos moleculares variam entre 12.800 e 79.000 daltons. O pico II apresentou 04 (quatro) bandas, cujos pesos moleculares são: 12.158, 16.074, 17.830 e 21.555 daltons (FIGURA 09B).

3.9 - Resposta do Tipo IgG₁ Induzida em Animais Imunizados com o ET e com a OVA

Os animais imunizados com 100 µg do ET + 1 mg de Al(OH)₃, (FIGURA 10A) não apresentaram título de PCA no 7º dia após a imunização. Mas, no 14º dia detectou-se um título igual a 0,5, que subiu para 1,5 no 21º dia e após o 1º reforço, aos 28 dias o título foi igual a 6, subindo para 6,5 no 35º dia, quando foi dado o 2º reforço. Houve um acréscimo de título aos 42 dias onde foi alcançado valor igual a 8,5.

Para efeito de comparação, animais foram imunizados com 100 µg de OVA + 1 mg de Al(OH)₃, cujos resultados da síntese de IgG₁ estão mostrados na FIGURA 10A. Pode ser observado que não houve resposta primária, sendo que apenas após o primeiro reforço, os animais imunizados com OVA apresentaram título de IgG₁ igual a 7, que desceu para 6 aos 35 dias e após o segundo reforço, alcançou título igual a 7 aos 42 dias.

Para os animais imunizados com 100 µg de ET sem adjuvante, FIGURA 10B, não se detectou níveis de IgG₁ no 7º dia após a imunização, sendo que no 14º dia houve o aparecimento de um título igual a 0,5. No 21º dia detectou-se um título igual a 0,5 que subiu para 5 no 28º dia. O título baixou para 4,5 no 35º dia, retornando a 5 aos 42 dias.

A nível de comparação foi feita também imunização com OVA na ausência do adjuvante. Para a síntese de anticorpos do tipo IgG₁ (FIGURA 10B, não foi detectada resposta primária. Após o primeiro reforço, aos 28 dias, alcançou-se título igual a 7 que permaneceu constante, mesmo após o 2º reforço.

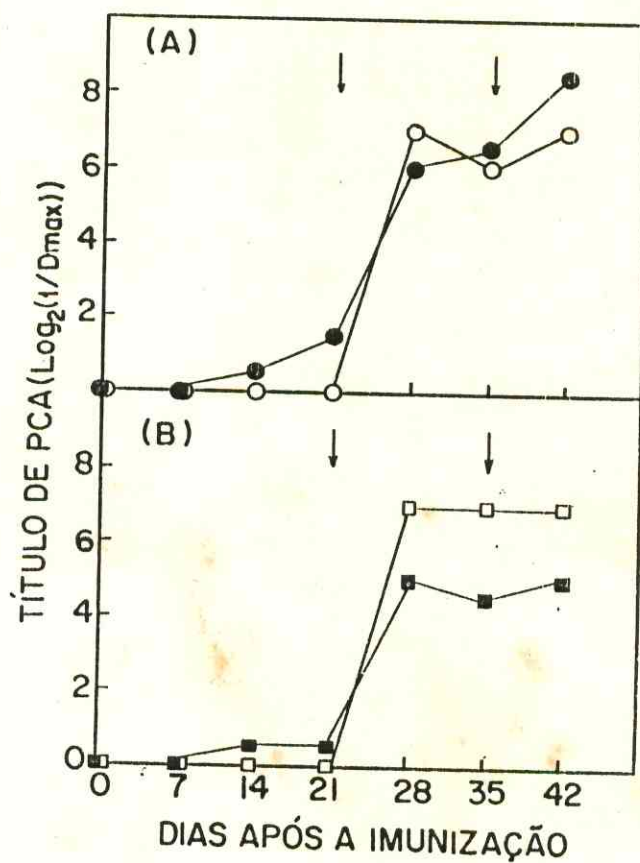


FIGURA 10 - Resposta do tipo IgG₁ em camundongos imunizados com 100 µg do ET + 1 mg de Al(OH)₃ (A●—●), com 100µg de OVA + 1 mg de Al(OH)₃ (A○—○) com 100 µg do ET (B■—■) e com 100 µg de OVA (B□—□). As reações de PCA foram desencadeadas após um período de latência de 2 horas, com 500 µg da fração utilizada para imunização. As setas indicam os dias em que foram dados reforços. Os 4 tratamentos não diferiram entre si a nível de 5 % (F = 2,55).

3.10 - Resposta do Tipo IgE Induzida em Animais Imunizados com o ET e com a OVA

As reações de PCA nos animais imunizados com 100 µg do ET + 1 mg de Al(OH)₃, FIGURA 11, apresentaram título igual a 1 no 7º dia após a imunização inicial chegando a zero no 14º dia e subindo para 0,5 no 21º dia. Após o 1º reforço houve um aumento no título, que alcançou 7 aos 28 dias e baixou para 5 aos 35 dias. Após a aplicação do 2º reforço, o título de PCA subiu, alcançando valor 7,5 aos 42 dias.

No tocante a resposta do tipo IgE, os animais imunizados com 100 µg de OVA + 1 mg de Al(OH)₃ não apresentaram resposta primária (FIGURA 11A). Aos 28 dias, logo após o segundo reforço, alcançou-se título de IgE igual a 7 que desceu para 5 aos 35 dias. Após o segundo reforço, aos 42 dias, houve um novo aumento de título, alcançando-se valor igual a 6,5.

Os animais imunizados com 100 µg de ET sem adjuvante, FIGURA 11B, apresentaram uma discreta resposta primária aos 21 dias com um título igual a 0,5. Depois do primeiro reforço, aos 28 dias, foi detectado níveis séricos de IgE com um título igual a 6,5. Aos 35 dias o título baixou para 3, subindo para 5,5 aos 42 dias, 7 dias após o 2º reforço.

Para a resposta do tipo IgE, não foi detectada resposta primária nos animais imunizados com 100 µg de OVA na ausência do adjuvante. Mas, após o primeiro reforço, observou-se título de IgE igual a 7 que baixou para 2,5 aos 35 dias e subiu para 3 aos 42 dias, 7 dias após o segundo reforço.

3.11 - Resposta do Tipo IgG₁ Induzida em Animais Imunizados com as Frações Protéicas

Para os animais imunizados com 100 µg da F0-50 %,

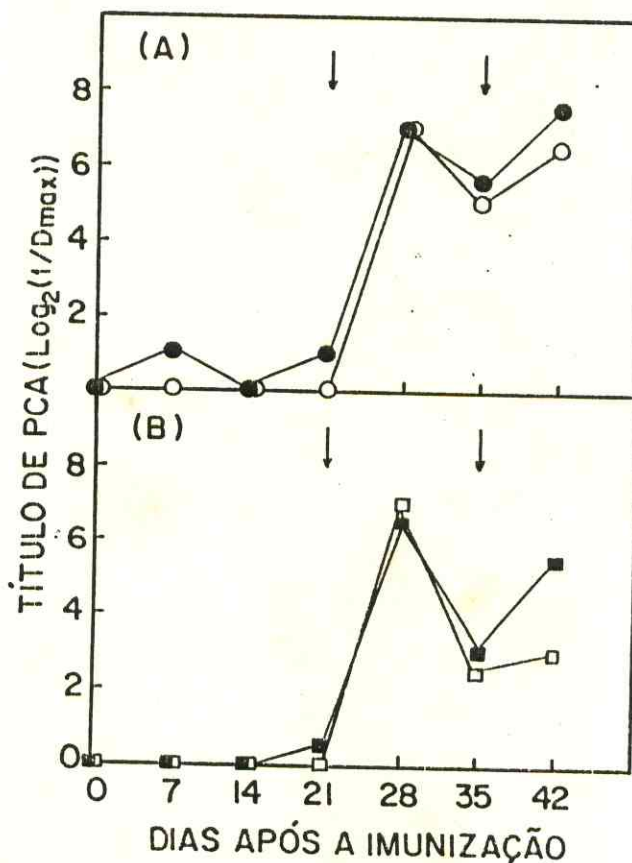


FIGURA 11 - Resposta do tipo IgE em camundongos imunizados com 100 μ g do ET + 1 mg de Al(OH)₃ (A●—●), com 100 μ g de OVA + 1 mg de Al(OH)₃ (A○—○), com 100 μ g do ET (B■—■) e com 100 μ g de OVA (B□—□). As reações de PCA foram desencadeadas após um período de latência de 22 horas. As setas indicam os dias em que foram dados os reforços. Os tratamentos que levaram Al(OH)₃ diferiram estatisticamente a nível de 5 % daqueles que não tiveram adjuvante ($F=7,14$). Os tratamentos sem adjuvante foram estatisticamente iguais, mas apresentaram diferença no tempo ($F=114,38$).

FIGURA 12A, não foi detectado IgG_1 , no 7º dia, sendo que no 14º dia detectou-se um título igual a 1 que subiu para 3 no 21º dia. Após a aplicação do 1º reforço, o título aumentou alcançando valor igual a 8 no 28º dia e permaneceu constante até o 42º dia, mesmo após o reforço dado aos 35 dias.

Os animais imunizados com 100 µg da F50-70 %, FIGURA 12B, não apresentaram níveis séricos de IgG_1 detectáveis no 7º dia após a imunização, mas como nos animais imunizados com 100 µg da F0-50 %, eles alcançaram um título igual a 1 no 14º dia, subindo para 3 no 21º dia. O título subiu para 7 no 28º dia e permaneceu constante até o 35º dia, quando atingiu o valor de 8 aos 42 dias.

Para os animais imunizados com 100 µg da fração F70-90 %, FIGURA 12C, alcançou-se título igual a 1 no 14º dia, que subiu para 3 no 21º dia, quando foi dado o 2º reforço. Foi detectado um título igual a 8 no 28º dia, que baixou para 7 aos 35 dias. Com o 2º reforço, o título subiu para 8 aos 42 dias.

3.12 - Resposta do Tipo IgE Induzida pelas Frações Protéicas

Para os animais imunizados com 100 µg da F0-50 %, FIGURA 13A, as reações de PCA detectaram níveis séricos de IgE a partir do 7º dia após a imunização inicial, quando se obteve um título de PCA igual a 3. O título caiu para 1 no 14º dia e subiu para 2 no 21º dia. Após o 1º reforço, na resposta secundária, houve um aumento do título aos 28 dias para 8, baixando para 6 no 35º dia e subindo novamente para 8 no 42º dia, 7 dias após o 2º reforço.

Os camundongos imunizados com 100 µg da F50-70 %, FIGURA 13B, alcançaram título igual a 2 no 7º dia, que baixou para zero no 14º dia, assim permanecendo até o 21º dia, quando foi dado o 1º reforço. O título subiu para 6 aos 28 dias e caiu para 2 no 35º dia, alcançando novamente valor igual a 6 no 42º dia, isto é, 7 dias após o 2º reforço.

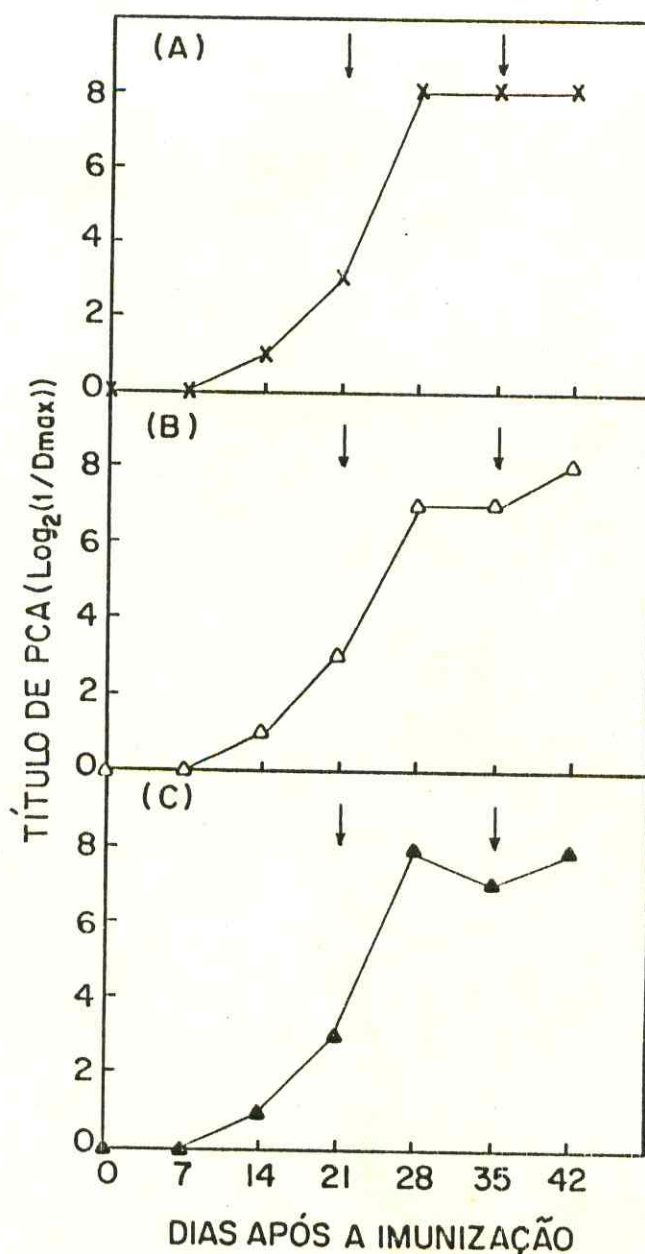


FIGURA 12 - Resposta do tipo IgG₁ em camundongos imunizados com 100 μ g das frações + 1 mg de Al(OH)₃. F0-50 % (Ax—x), F50-70 % (B Δ — Δ) e F70-90 % (C— $\blacktriangle$). As reações de PCA foram desencadeadas após um período de latência de 2 horas, utilizando-se 500 μ g da fração usada na imunização. As setas indicam os dias em que foram dados os reforços. Houve diferença estatística a nível de 5 % ($F = 8,00$), entre a fração F50-70 % e as demais frações, sendo que as frações F0-50 % e F70-90 % foram iguais entre si.

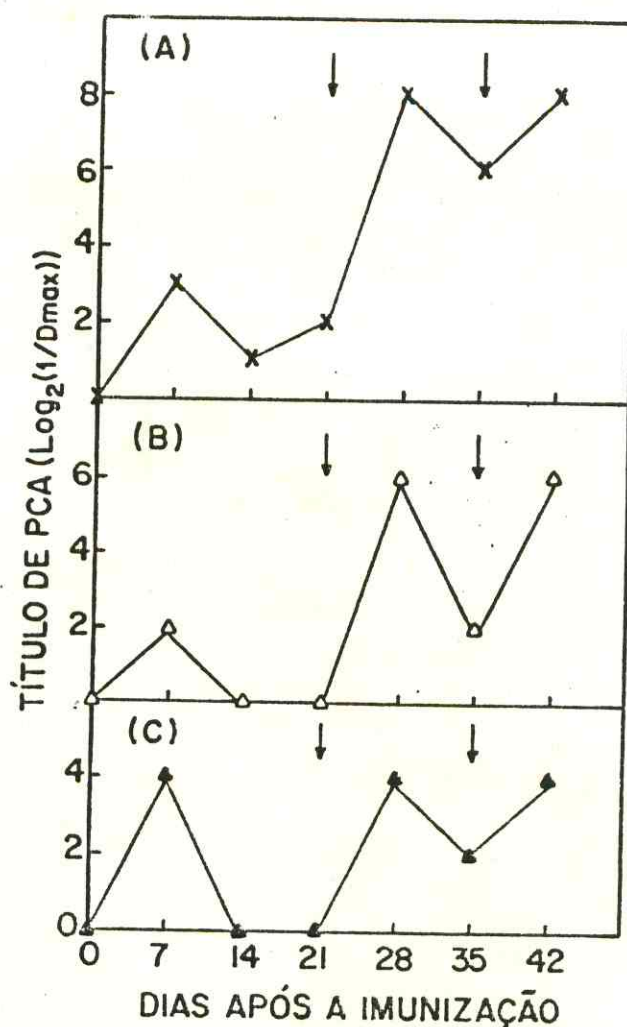


FIGURA 13 - Resposta do tipo IgE em camundongos imunizados com 100 μ g das frações + 1 mg de Al(OH) . F0-50 % (Ax—x) F50-70 % (BA—Δ) F70-90 % (▲—▲) . As reações de PCA foram desencadeadas após um período de lactência de 22 horas, com 2500 g da fração utilizada na imunização. As setas indicam os dias em que foram dados os reforços. Foi detectada diferença estatística a nível de 5 % ($F = 5,46$) apenas entre as frações F0-50 % e F70-90 %, sendo que as frações F0-50 % e F50-70% foram iguais entre si, as frações F50-70 % e F70-90 % também foram iguais entre si.

Nos camundongos imunizados com 100 µg da F70-90 %, a fração do extrato total que não possui lectina, FIGURA 13C, observou-se um título igual a 4 no 7º dia após a imunização. O título desceu para zero no 14º dia e assim permaneceu até o 21º dia. O título subiu para 4, após o 1º reforço, aos 28 dias e caiu para 2 aos 35 dias. No 42º dia, 7 dias após o 2º reforço, houve um novo aumento de título que alcançou o valor de 4.

4 - DISCUSSÃO

4.1 - Tentativas de Purificação da(s) Presumível(eis) Lectina(s) de Lablab purpureus

As proteínas de Lablab purpureus foram extraídas com PBS pH 7,4 (FIGURA 03) por ter sido este o tampão utilizado quando da extração de proteínas de outras variedades do Dolichos lablab estudadas anteriormente (FAVERO et al., 1986), KUMAR & RAO (1986) e GÜRAN et al. (1983)).

A atividade hemaglutinante do extrato total de Lablab purpureus foi testada em hemácias de diferentes espécies de animais (TABELA 03). De todas as hemácias testadas, o ET do Lablab purpureus aglutinou somente as hemácias de coelho e as hemácias humanas. As hemácias humanas foram aglutinadas de forma inespecífica com respeito aos grupos sanguíneos A, B e O, tal como ocorreu com as lectinas de Dolichos lablab que foram isoladas na Índia, (KUMAR & RAO 1986), Turquia, (GURAN et al., 1983) e França, (FAVERO (1986)).

Foi também testada a ação dos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} sobre a atividade hemaglutinante do extrato protéico. A adição destes íons não modificou a atividade hemaglutinante. Apesar disto a fração F0-50 % perdeu sua atividade hemaglutinante quando dialisada contra o PBS acrescido de EDTA 0,01 M e esta atividade foi recuperada após diálise contra PBS e adição dos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} 1,25 mM. Estes dados sugerem que no sítio ativo da(s) presumível(eis) lectina(s) presente(s) neste extrato existem íons que são fundamentais para que ela(s) exerça(am) sua atividade hemaglutinante. Uma vez dialisada(s) contra EDTA, esta(s) lectina(s) tiveram estes íons quelados e a atividade hemaglutinante bloqueada. Estes resultados são comparáveis aqueles encontrados por GÜRAN et al. (1983), onde foi mostrado que a lectina isolada de

Dolichos lablab apresenta os íons Mn^{2+} e Zn^{2+} no seu sítio de ligação, ou seja, é uma metaloproteína, cujos íons são essenciais às suas atividades. No entanto, a adição destes íons não aumentou a atividade hemaglutinante desta lectina.

A atividade hemaglutinante do extrato total de Lablab purpureus foi inibida preferencialmente pelos açúcares N-acetil-D-glicosamina e α -metil-D-manosídeo, seguida pela D-glicosamina, D-manose e D-glicose (TABELA 04) diferindo da lectina isolada das sementes provenientes da Turquia que é preferencialmente inibida pela N-acetil-D-glicosamina (GÜRAN *et al.*, 1983), mas não é inibida pela manose livre e diferindo também das lectinas isoladas de sementes da Índia que são inibidas pelos açúcares simples D-manose e D-glicose (KUMAR & RAO, 1986). Em recente trabalho PROUVOST-DANON *et al.* (1990) demonstraram que a liberação de histamina em basófilos humanos e mastócitos de camundongos pelo ET por nós preparado de Lablab purpureus foi inibida mais efetivamente pela N-acetil-D-glicosamina, seguida de D-manose e D-glicose. Por outro lado, quando a conA era utilizada para induzir a liberação de histamina, a situação invertia-se, passando manose a ser o açúcar mais inibidor da liberação de histamina do que a N-acetil-D-glicosamina.

As tentativas de purificação da lectina contida no ET de Lablab purpureus tiveram numa primeira etapa, um fracionamento com sulfato de amônio nos níveis de saturação 0-50 %, 50-70 % e 70-90 %, como é mostrado na FIGURA 03. A precipitação por sulfato de amônio conseguiu concentrar na fração 0-50 %, 70 % da atividade hemaglutinante ficando apenas 5 % retida na fração F50-70 %, sendo que a fração F70-90 % não apresentou atividade (TABELA 01). Estes dados são semelhantes aos obtidos com as variedades lignosus e tipicus de Dolichos lablab (KUMAR & RAO, 1986), onde as lectinas foram precipitadas principalmente nos níveis de saturação de sulfato de amônio de 0-60 %. Um segundo fracionamento do ET com sulfato de amônio nos níveis de saturação 0-30 %, 30-40 % e 40-50 %, mostrou-se ineficaz para uma maior purificação da lectina, uma vez que a fração F30-40 % que apresentou-se a mais purificada, sua atividade hemaglutinante

específica foi semelhante àquela encontrada para a fração F0-50 %. Como a atividade hemaglutinante induzida pelo ET de Lablab purpureus é inibida, embora fracamente, por glicose, isto demonstra a especificidade da lectina por este açúcar. Lectinas com especificidade para glicose, tal como conA, são satisfatoriamente isoladas quando passadas através de colunas de gel de Sephadex pelo fato de ser este, um polímero composto por ligações cruzadas de dextrana, um derivado da glicose. No entanto, as atividades hemaglutinantes presentes no ET e nas frações F0-50 % e F30-40 % não ficaram retidas nas colunas de Sephadex G-100 (SILVA-LIMA *et al.*, 1988). Realmente, as lectinas isoladas por KUMAR & RAO (1986), bem como aquela isolada por GÜRAN *et al.* (1983) das sementes de Dolichos lablab não se prendem ao gel Sephadex. Geralmente, as lectinas que são preferencialmente inibidas pelo N-acetil-D-glicosamina, como aquelas isoladas da batata (OWENS & NORTHCOTE, 1980) ou germe de trigo (NAGATA & BURGER, 1972) não foram isoladas por cromatografias em Sephadex mas por cromatografias de afinidades tendo uma glicoproteína ou o açúcar específico ligado a um suporte, ou por polímeros da N-acetil-D-glicosamina, como a quitina (BLOCH & BURGER, 1974). Apesar disto, FAVERO *et al.*, (1986) conseguiram reter em uma coluna de Sephadex G-100 boa parte da atividade hemaglutinante de sementes de Dolichos lablab de origem não definida. A fração assim retida, foi eluída com glicose 0,2 M e após ser passada através de uma coluna de afinidade (D-manopiranosídeo-agarose) apresentou um perfil eletroforético idêntico ao pico retido em Sephadex. Apesar da fração protéica dotada de atividade hemaglutinante não ficar retida em coluna de Sephadex, a passagem do ET de Lablab purpureus utilizado no presente trabalho, através da coluna de Sephadex G-100 levou a uma relativa purificação. Isto poderia ser atribuído a um retardamento da passagem da lectina que de alguma maneira interageria fracamente com a coluna. Houve uma separação de 02 (dois) picos, sendo que o pico II de ambos, ET e fração F30-40 % apresentaram atividade Hemaglutinante Específica (AHE) bem maior que aquela apresentada pelo pico I (FIGURA 05 e 06). A fração F0-50 % quan-

do passada através da coluna Sephadex G-100 também apresentou AHE maior no pico II em relação ao pico I, o que demonstra que a cromatografia conseguiu concentrar no pico II a maior parte da atividade hemaglutinante. A purificação parcial da lectina foi constatada através da eletroforese (FIGURA 09b) onde se verificou que o pico II apresenta apenas 04(quatro) bandas com pesos moleculares variando de 12.000 a 22.000 daltons, enquanto o pico I apresentou 11 (onze) bandas.

A lectina (ou lectinas) do Lablab purpureus não foi isolada através da coluna de afinidade com manose acoplada a epoxi-Sepharose-6B ativada. De acordo com os dados obtidos sobre a purificação de lectinas presentes em diferentes variedades de Dolichos lablab, foram empregados diferentes tipos de colunas de afinidade. GÜRAN et al. (1983) conseguiu apenas retardar a eluição da lectina de Dolichos lablab, sendo que, apenas uma pequena porção da lectina ficou retida na coluna de Sepharon glicosilado com D-manopiranosídeo, de acordo com a metodologia descrita por FILKA et al. (1978). O mesmo ocorreu quando ele usou uma coluna de N-acetil-D-glicosamina-Sepharon. Entretanto, KUMAR & RAO (1986) conseguiram isolar através de uma coluna manose-Sepharose, as lectinas presentes nas variedades lignosus e tipicus de Dolichos lablab. Já a lectina isolada por FAVERO et al. (1986) prendeu-se ao gel de Sephadex G-100 sendo esta propriedade peculiar para tal variedade, uma vez que as outras, inclusive o Lablab purpureus por nós utilizado, não se prenderam a este gel. A variabilidade dos resultados obtidos dos diferentes métodos de isolamento de Lablab purpureus pode ser atribuída a uma peculiaridade da(s) lectina(s) destas sementes. Como já foi mostrado anteriormente, a lectina de Lablab purpureus apresenta uma particularidade no tocante ao perfil dos açúcares inibidores da atividade hemaglutinante (SILVA-LIMA et al., 1988). A(s) lectina(s) de Lablab purpureus foram parcialmente purificadas por cromatografias em gel de Sephadex G-100, uma vez que a AHE apresentou-se mais elevada no pico II que no pico I (FIGURAS 06 e 07). O pico II deve ser analisado mais deta-

lhadamente, uma vez que ele apresentou perfil eletroforético com bandas dotadas de pesos moleculares semelhantes aqueles encontrados para as subunidades das lectinas, nas diferentes variedades do Dolichos lablab (KUMAR & RAO, 1986; GÜRAN et al., 1983; FAVERO et al., 1986). A dificuldade no isolamento desta(s) lectina(s) pode ser atribuída a uma alta especificidade com relação a presença de açúcares inibidores existente no extrato total, bem como nas frações. Além disto, a presença de receptores endógenos nas frações pode estar bloqueando os sítios de ligações da(s) lectina(s).

4.2 - Respostas do Tipo IgG₁

4.2.1 - Animais Imunizados com 100 µg de ET na Presença e na Ausência de 1 mg de Al(OH)₃

No estudo da imunogenicidade das proteínas de Lablab purpureus, camundongos "swiss" foram imunizados com 100 µg do ET de Lablab purpureus na presença e na ausência de 1 mg de Al(OH)₃, usado como adjuvante. Não foi observada diferença estatística significativa ao nível de 5 % entre os 04(quatro) tratamentos e em todos os tempos analisados, isto é, os animais imunizados com ET na presença e na ausência do adjuvante apresentaram respostas semelhantes às aquelas obtidas em animais imunizados com OVA na presença e na ausência do adjuvante. PROUVOST-DANON et al. (1972) demonstraram que OVA é um antígeno capaz de induzir uma resposta do tipo IgG₁, em camundongos, bastante elevada e que esta resposta aumenta com a elevação da dose e no decorrer do tempo. Uma resposta com este perfil, isto é, resposta do tipo IgG₁ aumentada ao longo do tempo, ocorreu nas imunizações com o ET de Lablab purpureus. Isto sugere a alta imunogenicidade das proteínas de Lablab purpureus levando-se em consideração que o ET é composto de várias proteínas em pequenas concentrações e que a OVA usada para efeito de com-

paração é uma proteína pura (FIGURAS 10A e 10B).

Já é conhecido que o gel de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) é essencialmente um adjuvante para a formação de anticorpos do tipo IgE (PROUVOST-DANON *et al.*, 1966) e não de IgG₁, o que explica a semelhança entre as respostas induzidas pelos antígenos na presença e na ausência do adjuvante.

4.2.2 - Animais Imunizados com 100 μg da Fração F0-50 % + 1 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$, 100 μg da Fração F50-70 % + 1 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$ e 100 μg da Fração F70-90 % + 1 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$.

Todas as frações apresentaram um perfil de síntese de IgG₁ bastante alto (FIGURAS 12A, 12B e 12C), principalmente quando comparadas com aqueles obtidos por imunizações com outras plantas, como a Dioclea grandiflora (NUNES, 1985), ou Artocarpus integrifolia (ALBUQUERQUE, 1987). As frações protéicas foram comparadas estatisticamente entre si. Ao nível de 5 %, as frações F0-50 % e F70-90 % apresentaram-se iguais e diferiram da fração F50-70 %. Assim, a fração F50-70 % mostrou-se menos imunogênica com respeito à produção de IgG₁ que a fração F0-50 % e que a fração F70-90 %. Portanto, a imunogenicidade, com respeito a produção de anticorpos do tipo IgG₁ das frações de Lablab purpureus parece ser devida à presença de proteínas com propriedades antigênicas bastantes acentuadas. A(s) presumível(eis) lectina(s) presente(s) nas frações F0-50 % e F50-70 % parece(m) não exercer nenhum efeito imunomodulador detectável na resposta do tipo IgG₁, uma vez que a fração que apresenta maior atividade hemaglutinante (F0-50 %) apresentou um nível de antigenicidade que é igual estatisticamente aquele obtido pela fração F70-90 %, que não possui atividade. Estes resultados concordam com os dados obtidos com o uso da jacalina que embora tendo especificidade para açúcares diferentes da lectina de Lablab purpureus, também não modulou a síntese de IgG₁ (ALBUQUERQUE, 1987).

4.3 - Respostas do Tipo IgE

4.3.1 - Animais Imunizados com 100 μ g do ET na Presença e na Ausência de 1 mg de $\text{Al}(\text{OH})_3$.

A resposta do tipo IgE para animais imunizados com 100 μ g do ET com 1 mg do adjuvante ($\text{Al}(\text{OH})_3$) apresentou um perfil que não difere estatisticamente ao nível de 5 % daquele apresentado pelos animais imunizados com OVA nas mesmas condições (FIGURA 11A). Os títulos encontrados não diferiram em nenhum dos tempos analisados. Como no caso da síntese de IgG_1 , poder-se-ia dizer que as proteínas de Lablab purpureus são bons imunógenos também para anticorpos do tipo IgE. Para os animais imunizados com ET na ausência do adjuvante ($\text{Al}(\text{OH})_3$) não houve diferença estatística ao nível de 5 % quando os resultados foram comparados aqueles obtidos pelos animais imunizados com OVA nas mesmas condições, (FIGURA 11B). Apesar de não ter havido diferença estatística entre estes dois tratamentos, uma análise estatística dos títulos ao longo do tempo, revelou uma diferença significativa a 5 % ($F = 114,38$) aos 42 dias, ou seja, após o segundo reforço, os animais imunizados com OVA praticamente não aumentaram o título, enquanto os animais imunizados com o ET sem adjuvante tiveram um aumento de 2,5 (duas e meia) unidades logarítmicas. Estes resultados sugerem que algum fator adicional esteja modulando de forma positiva a produção de IgE pelo ET. Isto porque, mesmo sendo a OVA um antígeno adequado para induzir uma alta resposta do tipo IgE, ela não foi capaz de, na ausência do adjuvante, provocar um aumento no título de anticorpos do tipo IgE após o segundo reforço. Já o ET de Lablab purpureus provocou um aumento de 2,5 (duas e meia) unidades logarítmicas após o segundo reforço. Lectinas são mitógenos que estimulam os linfócitos a um estado de crescimento e proliferação (LIS & SHARON, 1977), e promovem a liberação pelas células T, de fatores solúveis (linfocinas), como a inter-

leucina-2, que auxilia na proliferação de células B ativadas por mitógenos ou antígenos T-dependentes (KLAUS & HAWRILOWICZ, 1984). Portanto, a presença de lectina(s) no ET poderia(m) estar exercendo um efeito imunomodulador positivo na resposta do tipo IgE induzida pelas proteínas do ET. Resultados preliminares em colaboração com RUMJANEC (comunicação pessoal) mostraram que o ET de Lablab purpureus estimula células esplênicas de camundongos a proliferarem "in vitro", sugerindo fortemente que a lectina de Lablab purpureus seria um mitógeno do tipo T.

Um efeito de dose elevada de antígeno inibindo a resposta do tipo IgE poderia ser invocado para explicar o resultado obtido quando OVA (100 µg) e ET contendo 100 µg de várias proteínas foram usados como antígenos. Estudos anteriores já haviam revelado a influência da dose do antígeno na resposta do tipo IgE (VAZ & LEVINE, 1970; VAZ et al., 1970; PROUVOST-DANON et al., 1977). Entretanto, no caso presente, isto não vinha sendo revelado nas respostas dos tempos anteriores.

Os resultados obtidos pelas imunizações com o ET e OVA sem adjuvante diferiram estatisticamente ao nível de 5 % daqueles obtidos pelos animais imunizados com OVA e ET na presença do adjuvante (% = 7,14) sendo que os antígenos que não levaram adjuvante mostraram-se menos imunogênicos. O gel de $Al(OH)_3$ já é um conhecido modulador da síntese de IgE, (PROUVOST-DANON et al., 1977). Ele age estimulando populações de linfócitos T auxiliares e/ou fatores regulatórios para a síntese de IgE (UEDE & ISHIZACA, 1982). Portanto, esta diferença de resultados encontrada nos tratamentos com e sem adjuvante pode ser devido a ação do mesmo.

4.3.2 - Animais Imunizados com 100 µg da Fração F0-50 % + 1 mg de $Al(OH)_3$, 100 µg da Fração F50-70 % + 1 mg de $Al(OH)_3$ e 100 µg da Fração F70-90 % + 1 mg de $Al(OH)_3$.

No que diz respeito a síntese de IgE, a fração F0-50 % apresentou-se estatisticamente diferente da fração F70-

90 % e igual à fração F50-70 %, que por sua vez foi igual à fração F70-90 % (FIGURAS 14a, 14b e 14c). Os resultados estatísticos revelaram que a fração F0-50 % é mais imunogênica que a fração F70-90 %, seguida da fração F50-70 %. Levando-se em consideração que a fração que contém maior atividade hemaglutinante (F0-50 %) é aquela que se apresenta mais imunogênica, mais uma vez poderia ser sugerido que esta(s) lectina(s) apresentaria(m) efeito imunomodulador positivo na síntese de IgE pelas proteínas de Lablab purpureus e este efeito seria dose-dependente, ou seja, a medida que se eleva a quantidade de lectina(s), eleva-se também o título de anticorpos do tipo IgE produzidos. O efeito revelado de uma possível modulação de síntese de IgE pela lectina, a qual não ocorreu na síntese de IgG₁, põe em evidência a existência de dois sistemas distintos envolvidos na síntese destes dois anticorpos (JARRETT 1984).

5 - CONCLUSÕES

01 - as sementes de Lablab purpureus são dotadas de atividade hemaglutinante, como foi evidenciado no extrato total que apresentou Atividade Hemaglutinante Específica (AHE) igual a 16;

02 - a atividade hemaglutinante presente no ET foi detectada mais fortemente nas frações protéicas precipitadas com sulfato de amônio nos níveis de saturação 0-50 % e 30-40 %. A fração F50-70 % apresentou pouca atividade hemaglutinante, sendo que a fração F70-90 % não possui atividade;

03 - o extrato total aglutina hemácias de coelho, bem como hemácias humanas de maneira inespecífica para os grupos sanguíneos A, B e O e não aglutina hemácias de camundongos de cobaias, nem de carneiro;

04 - a atividade hemaglutinante do extrato total não é aumentada pela adição dos íons Ca^{2+} e Mn^{2+} 1,25 mM, mas esta atividade é bloqueada pelo EDTA 0,01 M sugerindo a presença de íons no sítio de ligação da presumível lectina;

05 - a atividade hemaglutinante do extrato total é inibida preferencialmente pelos açúcares N-acetil-D-glicosamina e α -metil-D-manosídeo, seguido pela D-glicosamina, D-manose e D-glicose. Esta atividade não foi inibida pela N-acetil-D-galactosamina, D-lactose, L-fucose, melibiose e rafinose;

06 - a lectina não se prendeu ao gel Sephadex G-100, contudo foi observada purificação parcial nos segundos picos obtidos pelo extrato total, pela fração F0-50 % e pela fração F30-40 %.

07 - a lectina de Lablab purpureus não se ligou também à coluna de afinidade de manose acoplada a epoxi-Sepharose-6B, apesar de se ligar especificamente ao açúcar livre;

08 - o extrato total, bem como as frações protéicas de Lablab purpureus mostraram-se bastantes imunogênicas com respeito à síntese de anticorpos dos tipos IgG₁ e IgE em camundongos, quando comparadas a um antígeno-padrão como a ovalbumina;

09 - a lectina parece não exercer um efeito imunomodulador na resposta do tipo IgG₁ em animais imunizados com o extrato total, uma vez que não houve diferença estatística quando os resultados obtidos com o extrato total foram comparados aqueles obtidos com a ovalbumina;

10 - a lectina parece exercer um efeito imunomodulador positivo nas respostas obtidas pelo ET, principalmente com respeito à resposta do tipo IgE onde, mesmo sem o adjuvante, o ET alcança títulos de anticorpos na resposta secundária superiores aos da ovalbumina;

11 - o efeito imunomodulador positivo exercido sobre as respostas do tipo IgE pela lectina foi confirmado pelos resultados obtidos com as frações semipurificadas, onde a fração F0-50 % que possui maior quantidade de lectina apresentou níveis de IgE superiores aqueles encontrados para a fração F50-70 % que possui pouca lectina e a fração F70-90 %, que não possui lectina;

12 - para as frações, também não foi detectado efeito imunomodulador da lectina na resposta do tipo IgG₁, já que a fração F70-90 % que não possui lectina, induziu síntese de IgG₁ que foi estatisticamente igual àquela induzida pela fração F0-50 %, a fração que possui mais lectina.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, D.A. Imunogenicidade de frações protéicas de Artocarpus integrifolia L. e imunomodulação exercida pela jacalina. Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 1987.
- ANDERSSON, J.G. MOLER & O. SJOBERG, Eur. J. Immunol. 2,99-101, 1972. Citado por LIS & SHARON, 1977.
- ASTORQUIZA, M.J. & S. SAYAGO. Modulation of IgE response by phytohemagglutinin. Int. Archs. Allergy Appl. Immun. 73: 367-369, 1984.
- AUB, J.C.; C. TIESLAU & A. LANKESTER. Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes. I. Wheat germ lipase and associated mucopolysacharides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 50: 613-619, 1963.
- BARONDES, S.H. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. TIBS 13:480, 1988.
- BAUMANN, C., H. RUDIGER & A.D. STROBERG. A comparasion of the two lectins from Vicia cracca. FEBS LETTERS. 102 (2):216-218, 1979.
- BECKER, J.W., B.A. CUNNINGHAM & J.J. HEMPERLY. Structural subclasses of lectins from leguminous plant. In Chemical Taxonomy, Molecular Biology and Function of Plant Lectins. Ed. I.J. GOLDSTEIN, M.E. ETZLER. New York: Liss. 37-45, 1983.
- BECKER, W.H. & M.M. SHARKEY. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 39, 337-341, 1970. Citado por LIS & SHARON, 1977.

- BLOCH, R. & M.M. BURGER. Biochem. Biophys. Res. Commun. 58, 13-19, 1974. Citado por LIENER et al., 1986.
- BOWLES, D.J. & H. KAUSS. Characterization, enzymatic and lectin properties of isolated membranes from Phaseolus aureus. Biochimica et Biophysica Acta. 443:360-374, 1976.
- BOYD, W.C. & R.M. REGUERA. J. Immunol. 62, 333, 1949. Citado por LIS & SHARON, 1977.
- BOYD, S.C. & SHAPLEIGH. Antigenic relations of blood group antigens as suggested by tests with lectins. J. Immunol. 73:226-31, 1954.
- BOYD, W.C. The lectins: their present status. Vox Sang. 8: 1-32, 1963.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254, 1976.
- BUNN-MORENO, M.M. & CAMPOS-NETO. Lectin(s) extracted from seeds of Artocarpus integrifolia (jack fruit): potent and selective stimulator(s) of distinct human T and B cell functions. J. Immunol. 127(2), 427-429, 1981.
- CALICH, V.L.G. & C.A.C. VAZ. Imunologia Básica. Artes Médicas Ltda, São Paulo, 1988.
- CAMPBELL, P.A., A.L. HARTMAN & C.A. ABEL. Stimulation of B cells, but not T cells or thymocytes, by a sialic acid-specific lectins. Immunology. 45, 155-162, 1982.
- COFFMAN, R.L., J. OHARA, M.N. BOND & J. CARTY. B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. J. Immunol. 120, 2, 1986.
- COHEN, S., E. PICK & J.J. OPPENHEIM. "biology of the Lymphokines", Academic Press, New York, 1979.

- DETERMAN, H. Gel Chromatography. Springer-Verlag, 2nd, New York, 202, 1969.
- DOUGLAS, S.D.; R.M. KAMIM & M.H. FUDENBERG. Human lymphocyte response to phytomitogens in vitro: normal, agammaglobulinemic and paraproteinemic individuals. J. Immunol. 103, 1185-1195, 1969.
- DUBOIS, M., K.A. GILES, J.K. HAMILTON, P.A. REBERS & F. SMITH. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem. 28(3), 350-356, 1956.
- EHRlich, P. Otsch. Med. Wochenschr. 17, 1218, 1981. Citado por LIS & SHARON, 1977.
- Von EISLER M. & Von L. PROTHEIN. Ber. Disch. Ges. 29-419-430, 1911. Citado por PUSZTAI et al., 1983.
- ELFSTRAND, M. Gorbersdorfer Veroffentlichungen (R. Kobert. ed.). Enke Stuttgart, 1-159, 1989. Citado por LIENER et al., 1986.
- ELSON, C.O. J.A. HECK & W. STROBER. T cell regulation of murine IgA synthesis. J. Exp. Med. 149, 632-43, 1979.
- ERSSON, B., K. ASPERG & J. PORATH. The phytohemmagglutinin from sun hemp seeds (Crotalaria juncea). Purification by biospecific affinity chromatography. Biochimica et Biophysica Acta. 310:446-452, 1973.
- ETZLER, M.E. & E.A. KABAT. Purification and characterization of a lectin (plant hemagglutinin) with blood group a specificity from Dolichos bioflorus. Biochemistry 9(4): 869-877, 1970.
- ETZLER, M.E. Plant lectins: Molecular and biological aspects. Ann. Rev. Plant. Physiol. 36:209-34. 1985.
- FAVERO, J., F. MIQUEL, J. DORNAND, M. JANICOT & J.C. MANI. Dolichos lablab agglutinin: a potent T lymphocyte mitogen and a high interleukin-2 promoter. Lectins. 5.391-398, 1986.

- FILKA, K., J. COUPEK & J. KOCOUREK. XL-o-glycosyl derivatives of spheron in affinity chromatography of lectins, Biochimica et Biophysica Acta. 539, 518-528, 1978.
- FINKELMAN, F.D., J. HOLMES, J.F. URBAN, W.E. PAUL & I.M. KATONA. T help requirements for the generation of an in vivo IgE response: a late acting form of T cell help other than IL-4 is required for IgE but not for IgG₁ production. J. Immunol. 142(2), 403-408, 1989.
- GELL, P.F.H. & R.R.A. COOMBS. Clinical aspects of immunology. Blackwell Scient Publ. a. Oxford, 1968.
- GOA, J.A. Microbiuret method for protein determination. Determination of total protein in cerebrospinal fluid. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 5, 218-222, 1953.
- GOLLAPUDI, V.S.S. & L.S. KIND. Enhancement of reagenic antibody formation in the mouse by concanavalin A. Inter Archs Allergy Appl. Immunology. 48, 94-100, 1975.
- GOLDSTEIN. I.J. & C.E. HAYES. The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. Adv. Carbohydr. Chem. Biochem. 35:127-340, 1978.
- GOLDSTEIN, I.J., R.C. HUGHES, M. MONSIGNY, T. OSAWA & N. SHARON. What could be called a lectin? Nature 285:66, 1980.
- GREEN, W.R., Z.K. BALLAS & C.S. HENNEY. The role of lectin in lectin-dependent cell mediated cytotoxicity. The Journal of Immunology. 121:4, 1978.
- GREENE, W.C., T.A. FLEISHER & T.A. WALDMANN. Suppression of human T and B lymphocyte activation by Agaricus bisporus lectin. I-Suggestive evidence for a surfase "supressor" receptor in human lymphocytes. The Journal Immunology. 126(2), 580-586, 1981.
- GÜRAN, A., M. TICHÁ, K. FILKA & J. KOCOUREK. Isolation and

properties of a lectin from the seeds of the indian bean or Dolichos lablab. Biochem. J. 209:653-657, 1983.

HAMBLIN, J. & S.P. KENT. Possible role of phytohemagglutinin in Phaseolus vulgaris L. Nature New Biol. 245:28-30, 1973.

HELIN, R.M. & A. FROESE. Binding of the receptors for IgE by various lectins. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 65:81-4, 1981.

HIRASHIMA, M.J. YODI & K. ISHIZAKA. Regulatory role of IgE-binding factor from rat lymphocytes. III. IgE-specific suppressive factor with IgE-binding activity. J. Immunol. 125, 1441, 1980.

HIRASHIMA, H., J. YODOI & K. ISHIZAKA. Formation of IgE-binding factors by rat T lymphocytes. II. Mechanisms of selective formation of IgE-potentiating factors by treatment with Bordetella pertussis vaccine. J. Immunol. 127, 1804, 1981a.

HIRASHIMA, M., J. YODOI, T.F. MUFF & K. ISHIZAKA. formation of IgE-binding factors by rat T lymphocytes. III. Mechanisms of selective formation of IgE-suppressive factors by treatment with complete Freund's adjuvant. J. Immunol. 127, 1810, 1981b.

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.

HOWARD, I.K., H.J. SAGE & C.B. HORTON. Studies on the appearance and location of hemagglutinins from a common lentil during the life cycle of the plant. Arch Biochem. Biophys. 149:323-26, 1972.

IWATA, M., J.J. MUNOZ & K. ISHIZAKA, Modulation of the biologic activities of IgE-binding factor. IV-

Identification of glycosylation-enhancing factor as a Kalikrein-like enzyme. J. Immunol. 131, 1954, 1983.

JARRETT, E.E.E. Perinatal influences on IgE responses. Lancet 6, 797-799, 1984.

KATZ, D.H. Review. Recent studies on the regulation of IgE antibody synthesis in experimental animals and man. Immunology. 41, 1, 1980.

KLAUS, G.C.B. & C.M. HAWRYLOWICZ. Cell-cycle control in lymphocyte stimulation. Immunology Today. 5(1), 15-19, 1984.

KOCOUREK, J. & V. HOREJSIT Defining a lectin. Nature. 290: 118, 1981.

KUMAR, N.S. & R.D. RAO. The nature of lectins from Dolichos lablab. J. Biosci. 10(1):95-109, 1986.

KURISO, M., M. YAMAZAKI & D. MIZUNO. Cancer Res. 40, 3798-3803, 1980. Citado por LIENER et al., 1986.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T 4. Nature. 227, 680-685, 1970.

LIENER, J.E. Phytohemagglutinins (phytolectins) Ann. Rev. Plant. Physiol. 27:291-319, 1976.

LIENER, J.E., N. SHARON & J.J. GOLDSTEIN. The lectins. Academic. Press, Inc. 253, 1986.

LIS, H. & N. SHARON. Lectins: Their chemistry and application to immunology. In: The Antigens. 7, 429-529, 1977.

LIVINGSTON, J.N. & B.J. PURVIS. Effects of wheat germ agglutinin on insulin binding and insulin sensitivity of fat cells. Am. J. Physiol. 238:267-75, 1980.

MANAGE, L., A. JOSHI & K. SOHONIE. Toxicity to rats and

- mice of purified phytohaemagglutinins from four indian legumes, Toxicon. 10:89-91, 1972.
- MARTENS, C.L., T.F. HUFF, P. JARDIEU, M.L. TROUNSTINE, R.L. COFFMAN, K. ISHIZAKA & K.W. MOORE. cDNA clones encoding IgE-binding factors from a rat-mouse T-cell hybridoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 2460, 1985.
- MIALONIER, G., J.P. PRIVAT & M. MONSIGNY. Isolement, propriétés physico-chimiques et localisation "in vivo" d'une phytohémagglutinine de Phaseolus vulgaris L. (Var. rouge). Physiol. Vég. 11(3):519-537, 1973.
- MILLER, K. Immunobiology. 165, 132-146, 1983. Citado por LIENER et al., 1986.
- MIRELMAN, D., E. GALUN, N. SHARON & R. LOTAN. Inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin. Nature. 256: 414-16, 1975.
- MISHKIND, M.K. KEEGSTRA & B.A. PALEVITZ. Distribution of wheat germ agglutinin in young wheat plants. Plant Physiol. 66:950-55, 1980.
- MOREIRA, R.A., A.C. HORTA-BARROS, J.C. STEWART & Á. 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, 783-789, 1977.
- MOTA, I. & D. WONG. Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. Life Sci. 8, 813, 1969.
- MUNOZ, J.J. & K.R. BERGMAN. Bordetella pertussis: immunological and other biological activities. In Rose, N. (ed) Immunological series, Marcel Dekker, Inc. 4, 1-235, 1977.

- NAGATA, Y. & M.M. BURGER. Wheat germ agglutinin. Isolation and crystallization. J. Biol. Chem. 247, 2248-2250, 1972.
- NICHOLSON, G.L., J. BLAUSTEIN & M.E. ETZLER. Characterization of two plant lectins from Ricinus communis and their quantitative interaction with a murine lymphoma. Biochemistry. 13(1), 196-204, 1974.
- NOWEL, P.C. Phytohemagglutinin: an inhibition of mitosis in cultures of normal human leucocytes. Cancer Res. 20, 462-466, 1960.
- NUNES, D.C.S. Resposta imunológica à frações protéicas e lectinas de Dioclea grandiflora Mart. Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 1985.
- OLIVEIRA, J.T.A. Estudo comparativo das lectinas presentes em sementes de três representantes do gênero Artocarpus. Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 1980.
- OLSNES, S. & A. PIHL. Isolation and properties of Abrin: a toxic protein inhibiting protein synthesis. Eur. J. Biochem. 35:179-185, 1973.
- OPPENHEIN, J.J. & D.L. ROSENSTREICH. Prog. Allergy. 20, 65-194, 1976. Citado por SHARON et al., 1986.
- OVARY, Z. Cutaneous anaphylaxis in the albino rats. Archs Allergy. appl. Immunol. 3, 393, 1952.
- OWENS, R.J. & D.M. NORTHCOTE. The purification of potato lectin by affinity chromatography on a fetuin - Sepharose matrix. Phytochemistry. 18, 1861-1862, 1980.
- 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. Anticorps réaginis de la souris. Production et propriétés physico-chimiques, immuno-chimiques et biologiques. Thèse de doctoral d'Etat es Sciences Naturelle. Université Paris VII, 1972.

PROUVOST-DANON, A., R. BINAGHI, S. ROCHAS, G.Y. BOUSSAC-ARON. Immunochemical identification of mouse IgE. Immunology. 23(4), 481-491, 1972.

PROUVOST-DANON, A., J. WICZOLKOWSKA, R. BINEGHI & A. ABADIE. Mouse and rat IgE. Cross sensitization of mast cells and antigenic relationships. Immunology, 29, 151-162, 1975.

PROUVOST-DANON, A., A.WEYER, M. SILVA-LIMA, J. LAPEYRE, N. EXPERT-BEZANÇON, A. DELPIERRE & B. DAVID. Histamine release by Dolichos lablab lectin. Lectins, Biology Biochem. Clinical Biochemistry. Vol. 8, A. Kallikorn and T.C. Bog-Hansen, 1990.

PUEPPKE, S.G. Distribution of lectins in the Jumbo Virginia and Spanish varieties of the peanut, Arachis hypogaea, Plant. Physiol. 64:575-580, 1979.

PUSZTAI, Á. R.R.D. CROY, G. GRANT & J.C. STEWART. Seeds Lectins: Distribution location and biological role. In "Seed Proteins", Daussant, J.J. Mossé & J. Vaughan. Eds, Academic Press. New York, 53-82, 1983.

PUSZTAI, Á., W.B. WATT & J.C. STEWART. Erythro-and Lymphoagglutinins of Phaseolus acutifolius. Phytochemistry. 26, 1009-1013, 1987.

REISNER, Y. Immunopathol Immunotherapy Lett. 2, 2-4, 1987. Citado por SHARON & LIS, 1987.

RICHEL, C. & P. PORTIER. De l'action anaphylactique the

certain venins. C.R. Soc. Biol. 54, 170, 1902.

ROIT, J. Imunologia Básica. 4ª ed., Livraria Atheneu, Rio de Janeiro, 1983.

ROIT, J., J. BRASTOFF & D. HALE. Imunologia., Manole Ltda, São Paulo, 1989.

RUMJANEK, V. (Comunicação Pessoal).

SCHMIDT, E.L. Annu. Rev. Microbiol. 33, 355-376, 1979. Citado por LIENER et al., 1986.

SHARON, N. & H. LIS. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. Science 177, 949-59, 1972.

SHARON, N. Immunol. Today 5, 143-147, 1984. Citado por LIENER et al., 1986.

SHARON, N. & H. LIS: A century of lectins research (1888-1988). TIBS. 12:489-491, 1987.

SILVA-LIMA, M., Á. PUSZTAI, D.C. NUNES & M.E.L. FARIAS. Hemagglutinating activity of Dolichos lablab seed protein. Brazilian J. Med. Biol. Res. 21:219-222, 1988.

SIRAGANIAN. P.A. & R.P. SIRAGANIAN, Basophil activation of concanavalin A: Characteristics of the reaction. The Journal of Immunol. 112(6), 2117-2125, 1975.

SNAPPER, C.M., F.D. FINKELMAN & W.E. PAUL. Regulation of IgG₁ production by interleukin-4. Immunological Reviews 102, 51-75, 1988.

STILLMARK, H. Über Rizin ein giftiges Ferment aus dem Samen Von Ricinus communis L. und einigen anderen Euphorbiaceen. Inaug. Diss., Universidade de Dorpat. Estonia, 1888.

STROSBERG, A.D., M. LAUWEREYS & A. FORIERS. Molecular

- evolution of legume lectins. In Chemical Taxonomy, Molecular Biology and Function of Plant Lectins, Ed. I. J. GOLDSTEIN, M.E. ETZLER. New York: Liss. 7-20, 1983.
- SUEMURA, M., J. YODI, M. HIRASHIMA & K. ISHIZAKA. Regulatory role of IgE binding factors from rat T lymphocytes. I. Mechanisms of enhancement of IgE response by IgE-potentiating factor. J. Immunol. 125, 148, 1980.
- TERNYNCK, T. & S. AVRAMEAS. Techniques Immunoenzymatiques. Editions INSERH. 18-20, 1987.
- TIZARD, I.R. Immunology: an introduction. Saunders college Publishing Holt-Saunders. Japan, Philadelphia, New York, Chicago, São Francisco, Montreal, Toronto, London, Sidney, Tokyo, Mexico City, Rio de Janeiro, Madrir, 1984.
- UEDE, T. & K. ISHISAKA. Formation of IgE-binding factores by rat T lymphocytes. VI. Cellular mechanisms for the formation of IgE-potentiating factor and IgE-suppressive factor by antigenic stimulation of antigen-primed spleen cells. J. Immunol. 129, 1391-1397, 1982.
- UEDE, T., F. HIRATA, M. HIRASHIMA & K. ISHIZAKA. Modulation of the biologic activities of IgE-binding factors. I. Identification of glycosylation-inhibiting factor as a fragment of lipomodulin. J. Immunol. 130, 878, 1983.
- VAZ, N.M. & B.B. LEVINE. Imune responses of inbred mice to repetited low doses of antigen: relationship to histocompatibility (H-2) type. Science 168(3933), 852-854, 1970.
- VAZ, N.M., E.M. VAZ & B.B. LEVINE. Relationship between histo-compatibility (H-2) genotype and responsiveness to low doses of ovalbumin in the mouse. J. Immunol. 104(6), 1582-1574, 1970.
- VRETBLAD, P. Purification of lectins by biospecific Affinity chromatography. Biochim. Biophys. Acta. 434: 169-176, 1976.

- WATKINS, W.N. & W.T.J. MORGAN. Neutralization of the anti-H agglutinin in cell serum by simple sugars. Nature. 169 (430): 825-826, 1952.
- WEBER, K. & M. OSBORN. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Bio. Chem. 240, 4406-4412, 1969.
- XAVIER-FILHO, J. & R.A. MOREIRA. Visualization of proteinase inhibitors in SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 744(16), 4406-4412, 1978.
- YODOI, J.M. HIRASHIMA & K. ISHIZAKA. Regulatory role of IgE-binding factors from rat T lymphocytes. II. Glycoprotein nature and source of IgE-potentiating factor. J. Immunol. 125, 1436-1441, 1980.
- YODOI, J., M. HIRASHIMA & K. ISHIZAKA. Regulatory role of IgE-binding factors from rat T lymphocytes. V. Carbohydrate moieties in IgE-potentiating factor and IgE-suppressive factor. J. Immunol. 128, 289, 1982.
- ZURAW, B.L., M. NOUAKA, C. O'HAIR & D.H. KATZ. Human IgE antibody synthesis "in vivo": stimulation of IgE responses by pokeweed mitogen and selective inhibition of such responses by human suppressor factor of allergy (SFA). J. Immunol. 127, 116-77, 1981.

7 - COMUNICAÇÃO A CONGRESSO E TRABALHOS PUBLICADOS

Brazilian J Med Biol Res (1988) 21: 219-222

LETTER TO THE EDITOR

HEMAGGLUTININATING ACTIVITY OF *DOLICHOS LABLAB* SEED PROTEIN

M. SILVA-LIMA, Á. PUSZTAI*, D.C.S. NUNES and M.E.L. FARIAS

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade
Federal do Ceará, 60001 Fortaleza, CE, Brasil

*Rowett Research Institute, Bucksburn, Aberdeen AB2 9SB, Scotland, UK

The hemagglutinating activity of a crude extract and partially purified protein fractions from seeds of *Dolichos lablab* grown in the state of Bahia, Brazil, has been examined. The crude extract agglutinates rabbit erythrocytes non-specifically with respect to blood groups. The hemagglutination of rabbit erythrocytes induced by the crude extract of *D. lablab* was inhibited most effectively by N-acetyl-D-glucosamine (3 mM) and α -methyl-D-mannoside (3 mM) followed by D-glucosamine (6 mM), D-mannose (6 mM) and D-glucose (12 mM). The spectrum of sugar inhibition of the hemagglutinating activity of the Brazilian seeds combines the characteristics of seeds coming from Turkey and India as indicated by the preferential inhibitory effect exerted by N-acetyl-D-glucosamine and the inhibition by D-mannose and D-glucose. These data suggest that the Brazilian seeds may belong to a different variety of *Dolichos lablab*.

Key words: hemagglutinating activity, *Dolichos lablab*, lectin, seed proteins, N-acetyl-D-glucosamine, α -methyl-D-mannoside.

Arq. Biol. Tecnol. 31(1), abr., 1988

613

PROTEINS OF *Dolichos lablab*: HAEMAGGLUTININATING ACTIVITY AND IMMUNOLOGICAL RESPONSE INDUCED IN SWISS MICE

M. Erivalda L. Farias, M. Silva Lima and Diana C.S. Nunes

Dept. of Biochemistry and Molecular Biology. Federal University of Ceará.

We have demonstrated that a crude protein extract (CPE) of *D. lablab* seeds had haemagglutinating activity. In this work we present preliminary results on the IgG and IgE responses of mice immunized with CPE and the influence of the lectin present in the extract on these immunological responses. Swiss mice were subcutaneously immunized with 100 µg CPE with 1 mg Al(OH)₃ as adjuvant with booster injections on the 21st. and 35th. days. The kinetics of the IgG and IgE synthesis were comparable to the typical responses against ovalbumin in similar conditions. In order to investigate if the lectin present in the CPE played a role on the synthesis of IgG and IgE mice were immunized against 100 µg ovalbumin with and without 1 mg Al(OH)₃ and with 10 mg CPE (± 300 µg of the lectin). For the IgG synthesis the presence of CPE apparently did not modify the secondary answer on the first week after the first booster but a decrease of the PCA titres were found after it; the IgE synthesis was only revealed after the first booster with low PCA titres and they were kept stable until the 42nd. day. For clarifying a possible modulating effect of the lectin of *D. lablab* on mice IgG and IgE synthesis we need to get it isolated and attempts are being done in this respect.

(CAPES and CNPq).

PRELIMINARY EXPERIMENTS FOR THE ISOLATION OF THE LECTIN OF Dolichos lablab

M.E.L. Farias, M. Silva Lima and M.A.A. Furtado Neto
 Depto de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará. C.P. 1065.
 60.001, Fortaleza, Ceará

In a previous paper we have demonstrated the haemagglutinating activity of the seed protein Full extract (FE) of Dolichos lablab (Silva Lima et al. (1988) Brazilian J. Med. Biol. Res. 21:219). In this work we show the results of preliminary experiments to isolate the lectin from these seeds by affinity chromatography. The seed flour was stirred for 2h with phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, 1:10 (w/v) centrifuged at 10.000g for 20min and samples of the supernatant (FE) were poured on a Sephadex G-50 column; led by elution with PBS resulting only in one peak with a shoulder where the same haemagglutinating activity of the FE sample was recovered. As the affinity of the lectin present in the FE of D. lablab is higher for α -methyl-mannoside and mannose than for glucose, columns were prepared with Epoxi-Sepharose 6B coupled to these sugars and FE samples were applied to them. The lectin was not bound to these columns either. Recently, it has been shown that a crude extract of D. lablab seeds applied to a column of Sephadex G-100 produced two fractions (FI and FII) eluted with PBS and a third one (FIIT) eluted with 0.2 M glucose in PBS. Both FII and FIIT showed haemagglutinating activity (Favero et al. (1986) Lectins Vol.V p. 391). In our work we have obtained with a similar column of Sephadex G-100 only two peaks (PI and PII) both eluted with PBS and provided to haemagglutinating activity, higher in PII. No third peak has been found by us. Apparently, Brazilian seeds of Dolichos lablab belong to a different variety of the genus Dolichos as we have already suggested in a previous paper. Besides, it is still possible that more than one lectin is present in these seeds rendering more difficult the isolation procedures. We intend to continue this work until getting a satisfactory purification of the lectin.

(CNPq and CAPES)

Arq. Biol. Tecnol. 32(1), mai., 1989

F42

PRELIMINARY IDENTIFICATION OF THE CARBOHYDRATE RESIDUE OF A SERUM GLYCOPROTEIN OF *Didelphis marsupialis*

M. Silva Lima, H. Moussatché*, J. Perales* & M. E.L. Farias.

Deptº de Bioquímica e Biologia Molecular. Univ. Federal do Ceará. C.P. 1065. 60.001. Fortaleza, Ceará

*Deptº de Fisiologia e Farmacodinâmica. Fundação Oswaldo Cruz. C.P. 926. 20.010. Rio de Janeiro, R.J.

The self protection of *D. marsupialis* against *Bothrops jararaca* venom has been ascribed to a serum glycoprotein (FAB) of this animal (Perales, Muñoz & Moussatché(1986) An. Acad. brasil. Ciênc. 58:155). In this work we have tried a preliminary identification of the carbohydrate residue of FAB using three lectins with different sugar specificity: a) lectin purified of the seeds of *Dioclea grandiflora*; b) lectin of the seeds of *Artocarpus integrifolia* contained in a seed protein extract (specific for galactose); c) lectin of the seeds of *Dolichos lablab* contained in a protein fraction precipitated by 30-40% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (specific for N-acetyl-D-glucosamine, mannose, glucose). A haemagglutination was induced by 4 haemagglutinating units (H.U.) of each lectin in a 2% rabbit erythrocyte suspension (1 H.U. is taken as the amount of protein (ml^{-1}) in the last tube giving a strong 2+ reaction). FAB was used in a concentration range of 25 to 25.000 $\mu\text{g/ml}$ in order to inhibit selectively the haemagglutination induced by the lectins according to the carbohydrate specificity of them. The concentrations of FAB required to inhibit 50% of the haemagglutination induced by the lectins were: *D. lablab* 25.000 $\mu\text{g/ml}$, 625 $\mu\text{g/ml}$ for the lectin of *D. grandiflora* and 75 $\mu\text{g/ml}$ for the lectin of *A. integrifolia*. By these results we can suppose that galactose associated to mannose either to glucose or to glucose plus mannose are present in the molecule of FAB. This emphasize how useful lectins are as molecular probes to explore glycoproteins but in our case, it does not exclude the use of classical biochemical techniques to get a more precise and quantitative identification of the carbohydrate residue of the molecule of FAB.

(CNPq)

Arq. Biol. Tecnol. 32(1), mai., 1989

B44

ARTHUS REACTION INDUCED BY OVALBUMIN ASSOCIATED TO THREE DIFFERENT LECTINS

D.A. Albuquerque, M.E.L. Farias & M. Silva Lima

Deptº de Bioquímica e Biologia Molecular. UFC. C.P. 1065. 60.000 Fortaleza, Ceará

Lectins are very complex natural substances able altogether to function as antigens and as mitogens (Sharon & Lis (1988) *TIBS* 12,488). In this work we have induced Arthus reaction by using three different lectins as immunomodulators associated to ovalbumin (OV). Swiss mice were subcutaneously injected with 100 µg OV admixed with purified lectin of *D. grandiflora* (1 mg); purified lectin of *A. integrifolia*, jacalin (1 mg); lectin contained in a protein Full Extract (10 mg) of seeds of *D. lablab* and $Al(OH)_3$ gel (1 mg). Both lectins of *D. lablab* and *D. grandiflora* induced at the sites of injections, inflammation, hemorrhage and necrosis starting around the 7th day. The same reaction was not observed when ovalbumin was admixed either with jacalin or $Al(OH)_3$. The microscopic examination of the skin revealed mainly the presence of polymorphonuclear leucocytes when the lectins of *D. grandiflora* and *D. lablab* were associated to OV; mainly macrophages were microscopically observed in the presence of OV plus $Al(OH)_3$. Skin and muscle had a normal microscopic appearance when jacalin was used. It is noticeable the different sugar-specificity of the lectins: galactose for jacalin, glucose mannose for the lectin of *D. grandiflora* and N-acetyl-D-glucosamine, mannose and glucose for the lectin of *D. lablab*. We cannot say yet if the Arthus reaction is promoted by γ_2 antiovalbumin selectively induced by the lectins of *D. grandiflora* and *D. lablab* or if it is promoted by γ_2 anti these lectins.

(CNPq)



PAABS

VI CONGRESS

SBQ
XIV ANNUAL MEETING

Associação Pan-Americana das Sociedades de Bioquímica
Asociación Panamericana de Sociedades de Bioquímica
The Pan-American Association of Biochemical Societies
Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular

SÃO PAULO FEBRUARY 18-22, 1990

C - 21

SPECIFIC IgG₁ AND IgE IMMUNE RESPONSES
AND THEIR MODULATION INDUCED IN MICE BY
PROTEINS OF *Lablab purpureus*. M.E.L. Farias
and M. Silva Lima. Departamento de Bio-
química e Biologia Molecular. Universidade Federal do
Ceará. Fortaleza, Ceará. Brasil.

Seeds of the *Leguminosae* are known to be important sources of food allergens. These seeds are also known to be the richest source of lectins in plants. On the other hand, lectins, by their mitogenic capacities on lymphocyte cells are able to modulate the immune response. We have previously showed the presence of a lectin in the saline soluble proteins extracted from the seeds of *Lablab purpureus*. In this work we have used protein fractions containing or not lectin in order to study the specific IgG₁ and IgE answers in mice. These animals were subcutaneously immunized with those fractions admixed with or without Al(OH)₃ gel as adjuvant. IgG₁ and IgE synthesis were evaluated by PCA reactions respectively done in mice and rats. IgG₁ synthesis induced by crude protein extract (CPE) with or without Al(OH)₃ gel was as high as IgG₁ synthesis induced by pure ovalbumin, known to be a potent antigen for mice. In the secondary reaction the PCA titres obtained after immunization with CPE and without Al(OH)₃ gel were significantly higher than the ones obtained with ovalbumin without Al(OH)₃ gel. These results suggest a modulation of the synthesis of these antibodies by the lectin present in the CPE. Protein fractions obtained by precipitation of CPE with ammonium sulphate, containing different amounts of lectin or lectin-free were also used to immunize mice. The results confirmed the previous suggestion of a modulation by the lectin of the synthesis of these anaphylactic antibodies. Apparently this is a lectin dose dependent modulation.

Supported by: CNPq, FINEP, CAPES.

8 - ANEXOS

ANEXO 01 - Quadro de análise de variância para as respostas do tipo IgE induzidas pelo ET com e sem adjuvante e induzidas pela OVA com e sem adjuvante ($\text{Al}(\text{OH})_3$).

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	SQ	MSQ	F
Antígeno	3	13,48	4,4933	7,14
Tempo	6	432,36	72,06	114,38
AXT	18	22,65	1,26	2,0
Resíduo	28	17,50	0,63	
Total	55	485,99		CV=31,8 %

ANEXO 02 - Quadro de análise de variância para as respostas do tipo IgG₁ induzidas pelo ET com e sem adjuvante e induzidas pela OVA com e sem adjuvante (Al(OH)₃).

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	SQ	MSQ	F
Antígeno	3	8,6250015	2,8750005	2,5557
Tempo	6	529,67857	88,2797620	78,4750
AXT	18	19,74999	1,0972217	0,9754
Resíduo	28	31,499809	1,124932	
Total	55	589,53337		CV=37,3 %

ANEXO 03 - Quadro de análise de variância para as respostas do tipo IgE induzidas pelas frações F0-50 %, F50-70 % e F70-90 % com adjuvante $(Al(OH)_3)$.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	SQ	MSQ	F
Antígeno	2	23,52	11,76	5,46
Tempo	6	97,90	16,32	7,58
Interação	1	9,50	9,507	6,41
Erro	11	16,30	1,48	
Resíduo	12	25,80	2,15	
Total	20	147,23		CV=93 %

ANEXO 04 - Quadro de análise de variância para as respostas do tipo IgG₁ induzidas pelas frações F0-50 %, F50-70 % e F70-90 % com adjuvante (Al(OH)₃).

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	SQ	MSQ	F
Antígeno	2	2,66	1,33	8,0012
Tempo	6	261,14	43,52	261,2425
Interação	1	0,6325	0,63	5,0877
Erro	11	1,3675	0,1243	
Resíduo	12	2,0	0,166	
Total	20	265,80952		CV=20 %