

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**ESTUDO DO MECANISMO E MEDIADORES QUÍMICOS  
ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE PRÓ-INFLAMATÓRIA DAS LECTINAS  
DE SEMENTES DE *Vatairea macrocarpa* e *Dioclea violacea***

**NYLANE MARIA NUNES DE ALENCAR**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará como pré-requisito para obtenção do título de Doutora em Bioquímica

**Orientador: Prof. Dr. BENILDO SOUSA CAVADA**

**Co-orientador: Prof. Dr. RONALDO DE ALBUQUERQUE RIBEIRO**

**Fortaleza**

**2001**

Alencar, Nylane Maria Nunes

Estudo do Mecanismo e Mediadores Químicos Envolvidos  
na Atividade Pró-inflamatória das Lectinas de Sementes de  
*Vatairea macrocarpa* e *Dioclea violacea*

Nylane Maria Nunes de Alencar – Fortaleza, 2001

137f. il.

Orientador: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará.

Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular.

1. Inflamação. 2. Lectinas Vegetais. 3. *Vatairea macrocarpa*  
4. *Dioclea violacea*. 5. Migração de Neutrófilos.

**ESTUDO DO MECANISMO E MEDIADORES QUÍMICOS  
ENVOLVIDOS NA ATIVIDADE PRÓ-INFLAMATÓRIA DAS LECTINAS  
DE SEMENTES DE *Vatairea macrocarpa* e *Dioclea violacea***

NYLANE MARIA NUNES DE ALENCAR

Tese aprovada  
22 de fevereiro de 2001

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. ~~Benildo Sousa Cavada~~  
(Orientador)

Prof. Dr. ~~Ronaldo de Albuquerque Ribeiro~~  
(Co-orientador)

Prof. Dr. ~~Manoel Odorico de Moraes~~

Prof. Dr. David Neil Criddle

Dr. Márcio Viana Ramos

*“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importa quais sejam os obstáculos e as dificuldades. Se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independente das circunstâncias devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho. “*

*Dalai-Lama*

***Dedico este trabalho***

*A meu esposo Marcionílio  
A minhas filhas Camila e Raquel  
Aos meus pais  
A memória de minha avó Maria Nunes*

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador Professor Benildo Sousa Cavada, pela sua inestimável contribuição na minha formação científica e pela confiança em mim depositada.

Ao Professor Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, por ter me acolhido em sua equipe para realização deste trabalho e pelas críticas e sugestões que além de enriquecerem este estudo, contribuíram para minha formação na área de inflamação.

Ao Professor Fernando Cunha, pela gentileza de receber-me em seu laboratório e pela contribuição importante nos experimentos com culturas de células.

As bolsista de iniciação científica Kelly e Sabrina, pela importante contribuição na realização dos experimentos e pela convivência agradável e amiga.

A todos os colegas que fazem parte do LAFICA (Laboratório da Farmacologia da Inflamação e do câncer) pela cumplicidade do dia-a-dia de um laboratório de pesquisa. De maneira especial a Vilma pela ajuda na análise histopatológica

Ao Professor Odorico, pela maneira atenciosa de tratar os alunos da pós-graduação.

Ao grande cientista Carlos Alberto Flores, que apesar de ter partido para um lugar ao céu, foi o pioneiro do projeto lectina-inflamação desenvolvido entre o LAFICA e o BioMoLab (UFC).

A Ana Maria que além de amiga foi uma grande companheira em muitas etapas deste projeto, pelas suas idéias, postura científica e o seu incansável bom humor.

Aos colegas do BioMoLab (Laboratório de moléculas biologicamente ativas), principalmente os responsáveis pela tarefa árdua de isolar e purificar as lectinas usadas nesta pesquisa.

A Professora Ilka, pela atenção e pela qualidade de seu trabalho como Coordenadora da Pós-graduação em Bioquímica.

A Vanda, técnica do LAFICA , pela forma dedicada e responsável de realizar seu trabalho.

A Artemizia, pela atenção às solicitações de animais ao Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (UFC)

Aos funcionários dos Departamentos de Bioquímica e Biologia Molecular e de Fisiologia e Farmacologia (UFC).

Aos estudantes e funcionários do Laboratório de inflamação e dor – USP- Ribeirão Preto, pela acolhida e sugestões feitas durante o período que estive neste laboratório.

Aos amigos e companheiros Goretti e Célio, pelo apoio e incentivo e por terem assumido minhas atividades na disciplina de Bioquímica.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, que se mostraram prestativos e atenciosos, sempre que precisei.

Ao Márcio, pela ajuda e oportunidades a mim oferecidas.

Ao professor David, pelas correções e sugestões.

A Nádia , pelo carinho e amizade.

Aos meus pais que apesar das dificuldades fizeram da minha educação uma prioridade.

De forma especial, ao meu companheiro Marcionílio, incentivador constante dos meus projetos, sua ajuda foi fundamental para a concretização deste trabalho

As minhas filhas, Camila e Raquel, que apesar da pouca idade aprenderam a conviver e aceitar a minha ausência.

A minha irmã Noélia, pela presença nos momentos mais difíceis.

À FUNCAP, pelo apoio financeiro.

E a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

**Meu muito obrigado!**

## SUMÁRIO

**LISTA DE FIGURAS E TABELA**

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**RESUMO**

**ABSTRACT**

<b>I. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1. Lectinas	1
1.1. Definição e Classificação	1
1.2. Interação lectina carboidrato e elicitação de atividades biológicas	2
1.3. Lectinas Animais	6
1.4. Lectinas Vegetais	7
1.4.1 Lectinas de Leguminosas	8
1.4.1.1 Lectina de sementes de <i>Vatairea macrocarpa</i>	10
1.4.1.2. Lectina de sementes de <i>Dioclea violacea</i>	11
1.5. Lectinas como ferramentas no estudo da inflamação	12
2. A resposta inflamatória	13
2.1 Eventos celulares da resposta inflamatória	14
2.2. Papel das moléculas de adesão	15
2.3. Células inflamatórias: estrutura e função	18
2.3.1. Neutrófilos	19
2.3.2. Mastócitos, basófilos e eosinófilos	20
2.3.3. Macrófagos	21
2.4. Mediadores químicos envolvidos no recrutamento de células inflamatórias	23
2.4.1. Citocinas	26
2.4.1.1. Citocinas pró-inflamatórias	27
a) IL-1	27
b) Fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ )	28
c) Quimiocinas	30
3. Justificativas e Objetivos	33

<b>II. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>35</b>
1. Animais	35
2. Lectinas	35
3. Materiais utilizados	35
3.1. Drogas e reagentes	35
4. Modelos experimentais	39
4.1. Avaliação da atividade pró-inflamatória das lectinas	39
4.1.1. Modelo de peritonite	39
4.1.2. Curva dose-resposta da atividade pró-inflamatória das lectinas de <i>Dioclea violacea</i> e <i>Vatairea macrocarpa</i>	40
4.1.3. Quimiotaxia de neutrófilos in vitro	40
4.1.4. Bolsa de ar subcutânea	41
4.2. Mudanças na população de células residentes da cavidade peritoneal	41
4.2.1. Lavagem da cavidade peritoneal: depleção de células residentes	42
4.2.2. Pré-tratamento com tioglicolato: incremento da população de macrófagos na cavidade peritoneal	42
4.2.3. Pré-tratamento com o composto 48/80: depleção de mastócitos peritoneais	43
4.3. Modulação farmacológica da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por DvL ou Vmac	44
4.4. Cultura de células	44
4.4.1. Macrófagos peritoneais	44
4.4.2. Cultura de mastócitos	47
4.4.3. Cultura de células esplênicas totais	47
4.4.4. Cultura de células esplênicas aderentes e não aderentes	48
4.5. Investigação de atividade quimiotática no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais estimulados in vitro com DvL ou Vmac	51
4.5.1. Curva dose resposta	51
4.5.2. Curso temporal	51
4.6. Investigação da atividade quimiotática no sobrenadante obtido de cultura de mastócitos estimulados com DvL ou Vmac	52
4.7. Investigação de atividade quimiotática no sobrenadante de células de baço totais estimuladas com DvL	52

4.8. Investigação de atividade no sobrenadante de células de baço aderidas e não aderidas estimuladas com DvL	52
4.9. Modulação farmacológica dos sobrenadantes das culturas de células que apresentaram atividade quimiotática, quando estimuladas com as lectinas	53
4.9.1. Modulação farmacológica in vivo do sobrenadante de macrófagos estimulados com Vmac	53
4.9.2. Modulação farmacológica in vitro do sobrenadante de macrófagos estimulados com Vmac	54
4.9.3. Modulação farmacológica in vivo da atividade quimiotática do sobrenadante de células esplênicas totais estimuladas com DvL	54
4.9.4. Modulação farmacológica in vitro da atividade quimiotática do sobrenadante de células esplênicas totais estimuladas com DvL	55
4.10. Efeito do anticorpo anti-TNF- $\alpha$ e anti-IL-8 sobre os sobrenadantes obtidos das culturas estimuladas com Vmac ou DvL	55
4.11. Efeito do tratamento in vivo com anticorpos anti-IL-1 e anti-TNF- $\alpha$ sobre a migração de neutrófilos induzida por DvL ou Vmac	56
4.12. Investigação do envolvimento do domínio lectínico na atividade pró-inflamatória da DvL ou Vmac	57
4.13. Efeito da desnaturação térmica das lectinas sobre a migração de neutrófilos induzida por DvL ou Vmac	57
4.14. Efeito da desmetalização na atividade pró-inflamatória da DvL	57
4.15. Avaliação da atividade pró-inflamatória da DvL e Vmac no modelo de edema de pata	58
4.16. Investigação do envolvimento de leucócitos no edema de pata induzido pela DvL ou Vmac	58
4.16.1. Interferência da leucopenia na indução de edema de pata pelas DvL ou Vmac	59
4.16.2. Análises histopatológica do edema de pata induzido por DvL ou Vmac	59
4.17. Análise Estatística	59

### III. RESULTADOS

60

1. As lectinas de DvL e Vmac induzem migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de forma dose- e tempo dependente 60
3. Efeito das mudanças na população de células peritoneais na atividade pró-inflamatória da DvL e Vmac 64
  - 3.1. A migração de neutrófilos induzida por DvL ou Vmac é inibida quando se reduz a população de células residentes 64
  - 3.2. A migração de neutrófilos da Vmac, mas não da DvL foi potenciada pelo aumento da população de macrófagos residentes 65
  - 3.3. Depleção de população de mastócitos não altera a migração de neutrófilos induzida pela DvL ou Vmac 65
4. As lectinas de *D. violacea* e *V. macrocarpa* induzem migração de neutrófilos na cavidade de bolsa de ar subcutânea ('air pouch') 66
5. Dexametasona e talidomida, mas não MK-886, BN50730 e indometacina inibem a migração de neutrófilos induzida pela DvL ou Vmac no modelo de peritonite 72
6. O sobrenadante de cultura de macrófagos estimulados com Vmac, mas não com DvL induz migração de neutrófilos dose- e tempo-dependente 74
7. O sobrenadante da cultura de mastócitos estimulados com DvL ou Vmac não apresentam atividade quimiotática para neutrófilos 75
8. O sobrenadante de cultura de células esplênicas totais estimuladas com DvL possui atividade quimiotática 79
9. O efeito quimiotático do sobrenadante de células esplênicas totais estimuladas com DvL é dependente da participação de células aderentes e não aderentes 79
10. A atividade quimiotática presente no sobrenadante de culturas de células estimuladas com Vmac ou DvL, foi inibida pela dexametasona in vivo 83
11. A pré-incubação das culturas de macrófagos e células esplênicas com dexametasona inibe a liberação de fatores quimiotáticos induzida pela Vmac ou DvL 83
12. Substâncias quimiotáticas presentes nos sobrenadantes de culturas estimuladas com DvL e Vmac possuem pesos moleculares superiores a 5000 daltons 84
13. Anticorpos anti-TNF- $\alpha$ , mas não anti-IL-8, inibem in vivo a migração de 88

neutrófilos induzida pela Vmac ou DvL	
14. Atividade quimiotática dos sobrenadantes de células estimuladas com Vmac e DvL é inibida, <i>in vitro</i> , pelo anticorpo anti-TNF- $\alpha$ . O anticorpo anti-IL-1 inibe a atividade do sobrenadante de células estimuladas com DvL, mas não com Vmac	88
15. DvL e Vmac induzem efeito edematogênico de forma dose- e tempo dependente	92
16. Atividade edematogênica da DvL e Vmac é reduzida em animais leucopênicos	94
17. Edema de pata induzido por DvL e Vmac ocorre com infiltração celular	94
18. Os açúcares específicos da DvL e Vmac inibem suas atividades pró-inflamatórias	97
19. A desnaturação térmica abole o efeito pró-inflamatório da DvL e Vmac	97
20. A desmetalização da DvL bloqueia seu efeito pró-inflamatório	98
<b>IV. DISCUSSÃO</b>	<b>102</b>
<b>V. CONCLUSÕES</b>	<b>121</b>
<b>VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>123</b>

## LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1. Etapas da migração de neutrófilos	17
Figura 2. Obtenção e manuseio da cultura de macrófagos	46
Figura 3. Isolamento de mastócitos	49
Figura 4. Cultura de células esplênicas totais	50
Figura 5. A lectina de sementes de <i>D.violacea</i> induz migração de neutrófilos De forma dose- e tempo dependente	62
Figura 6. A lectina de sementes de <i>V.macrocarpa</i> induz migração de neutrófilos De forma dose- e tempo dependente	63
Figura 7. As lectinas de sementes de <i>D.violacea</i> e <i>V.macrocarpa</i> não induzem quimiotaxia de neutrófilos in vitro	67
Figura 8. A migração de neutrófilos induzida pelas lectinas de <i>D.violacea</i> e <i>V.</i> <i>macrocarpa</i> é inibida quando a população de células residentes é reduzida, pela lavagem da cavidade peritoneal	68
Figura 9. O aumento da população de macrófagos na cavidade peritoneal potencia a migração de neutrófilos induzida pela lectina de <i>V.macrocarpa</i> , mas não àquela induzida pela <i>D.violacea</i>	69
Figura 10. A depleção de mastócitos da cavidade peritoneal não altera a migração de neutrófilos induzida pelas lectinas de <i>D.violacea</i> e <i>V.macrocarpa</i>	70
Figura 11. As lectinas de <i>D.violacea</i> e <i>V.macrocarpa</i> induzem migração de neutrófilos no modelo de bolsa de ar subcutânea	71
Figura 12. Dexametasona e talidomida, mas não MK-886 e BN50730, inibem a migração de neutrófilos induzida pelas lectinas de <i>V.macrocarpa</i> e <i>D.violacea</i>	73
Figura 13. O sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados com a lectina de <i>V.macrocarpa</i> , induz migração de neutrófilos de forma dose- e tempo dependentes	76
Figura 14. O sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados com DvL não induz migração de neutrófilos	77
Figura 15. O sobrenadante de mastócitos em cultura estimulados com DvL ou Vmac não apresenta atividade quimiotática para neutrófilos	78
Figura 16. O sobrenadante de células esplênicas totais estimuladas com a lectina de <i>D.violacea</i> , induz migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal	81

de ratos, de forma dose- e tempo dependente	
Figura 17. O sobrenadante de células aderidas de baço estimuladas com DvL, induz migração de neutrófilos com a participação de células não aderidas	82
Figura 18. O pré-tratamento com dexametasona, mas não com MK-886 ou indometacina, inibe a migração de neutrófilos induzida pelo sobrenadante das culturas de macrófagos estimuladas com Vmac e células totais de baço estimuladas com DvL	85
Figura 19. A pré-incubação das culturas de macrófagos e células totais de baço com dexametasona, inibe a liberação de fatores quimiotáticos para o sobrenadante das células estimuladas com Vmac ou DvL.	86
Figura 20. As substâncias quimiotáticas presentes nos sobrenadantes das culturas de macrófagos estimulados com Vmac e células esplênicas com DvL possuem PMs superiores a 5000 Dalton.	87
Figura 21. O pré-tratamento dos animais com soro anti-TNF- $\alpha$ , mas não com o soro anti-IL-8, inibe a migração de neutrófilos induzida por Vmac e DvL in vivo	90
Figura 22. A pré-incubação com soro anti-TNF- $\alpha$ neutraliza a atividade quimiotática para neutrófilos do sobrenadante das culturas de macrófagos estimulados com Vmac e células de baço com DvL. Anti-IL-1 neutraliza o sobrenadante da cultura estimuladas com IL-1	91
Figura 23. O edema de pata induzido pelas lectinas de <i>D.violacea</i> e <i>V.macrocarpa</i> ocorre de forma dose- e tempo-dependente	93
Figura 24. Microfotografias representando a infiltração celular no edema de pata induzido pela injeção s.c. intraplantar de DvL ou Vmac	96
Figura 25. $\alpha$ -metil-D-manosídeo e $\alpha$ -D-galactose inibem respectivamente, o efeito pró-inflamatório da DvL e Vmac	99
Figura 26. A desnaturação térmica abole o efeito pró-inflamatório das lectinas de <i>D.violacea</i> e <i>V.macrocarpa</i>	100
Figura 27 A desmetalização da lectina de <i>D.violacea</i> com EDTA, bloqueia seu efeito pró-inflamatório	101
Figura 28. Hipótese de mecanismo para o efeito pró-inflamatório de Vmac	114
Figura 29. Hipótese de mecanismo para o efeito pró-inflamatório de DvL	115
Tabela 1. Efeito da leucopenia induzida pelo metrotrexate no edema de pata Induzido por DvL ou Vmac	95

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$	alfa
$\beta$	beta
$\gamma$	gama
$\mu\text{L}$	microlitros
BSA	Albumina sérica bovina
C5a, C3a	Terceiro e quinto fator do sistema complemento
CD	Cluster of differentiation
ConA	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
CPH	:Complexo principal de histocompatibilidade
CSF-1	Fator de estimulação e crescimento 1
Da	daltons
DMSO	dimetilsulfóxido
DvL	Lectina de <i>Dioclea violacea</i>
E.P.M.	Erro padrão da média
ELAM-1	Molécula de adesão de leucócito e endotélio 1
ENA-78	Peptídeo 78 ativador de neutrófilo, derivado de célula epitelial.
fMLP	N-formil-metil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina
Gal	Galactose
GCSF	Fator de estimulação de crescimento de granulócitos
GlyCAM	Molécula de adesão glicosilada
GM-CSF	Fator de estimulação de crescimento de granulócitos e monócitos
GMP-140	Proteína de membrana com peso molecular de 140 kD
HBSS	Meio de cultura
i.p.	intraperitoneal
ICAM-1, ICAM-2	Moléculas de adesão intercelular-1 e 2
IFN- $\gamma$	Interferon gama

IgG, IgA	Imunoglobulina G e A
IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10	Interleucinas-1,2,4,5,6,8 e 10
IL-1RI	Receptor de Il-1 tipo 1
IL-1RII	Receptor de Il-1 tipo 2
IP-10	proteína 10 induzida por Interferon
kDa	quilodaltons
LAM-1	Molécula de adesão de leucócito-1
LCA	Lectina de sementes de <i>Lens culinaris</i>
LFA-1	Fator ativador de linfócitos
LoLI	Lectina de sementes de <i>Lathyrus ochrus</i> (isolectina I)
LPS	Lipopolissacarídeo de <i>E.coli</i>
LT	Linfotoxinas
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
MØs	macrófagos
MAdCAM-1	Molécula de adesão encontradas em mucosas
MCP-1	Proteína quimiotática para monócitos-1
MIP	Proteína inflamatória de macrófagos
MNCF	Fator quimiotático para neutrófilos derivado de macrófagos
NMR	Ressonância magnética nuclear
NAP-2	Peptídeo ativador de neutrófilo-2
NO	Óxido nítrico
PAGE-SDS	Eletroforese em gel de poliacrilamida – Dodecil sulfato de sódio
P150	Proteína 150
PAF	Fator de agregação plaquetária
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PECAM-1	Molécula de adesão de célula endotelial e plaqueta
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandina D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>

PGF <sub>2</sub>	Prostaglandina F <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandina I <sub>2</sub>
PHA	Lectina de sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i>
PSA	Lectina de sementes de <i>Pisum sativum</i>
PSGL-1	Glicoproteína ligante de selectina P
PSL	Ligante de selectina P
PSPI/PSPII	Forma dimérica da proteína de sêmen de porco
RANTES	Regulação através da ativação normal de célula T (quimiocina)
RIP	Proteína inativadora de ribossomos
RNA	Ácido ribonucléico
PMPI	Meio de Cultura
s.c.	subcutâneo
TNF $\alpha$ e $\beta$	Fator de necrose tumoral alfa e beta
v.o.	Via oral
VCAM-1	Molécula de adesão vascular
Vmac	Lectina de sementes de <i>Vatairea macrocarpa</i>
WGA	Lectina de germe de trigo

## RESUMO

**Estudo do mecanismo e mediadores químicos envolvidos na atividade pró-inflamatória das lectinas de sementes de *Vatairea macrocarpa* e *Dioclea violacea*** – NYLANE MARIA NUNES DE ALENCAR. Tese apresentada ao Curso de pós-graduação em Bioquímica do Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como pré-requisito para obtenção do título de doutor em Bioquímica. Data da defesa: 22 de fevereiro de 2001. Orientador: Benildo Sousa Cavada.

As lectinas são proteínas que possuem no mínimo um sítio de ligação à açúcar, por isso, são capazes de interagir com células e elicitar uma variedade de fenômenos biológicos. Em trabalhos anteriores foi demonstrado que a atividade anti-inflamatória de algumas lectinas vegetais parece ocorrer através de um mecanismo competitivo entre as lectinas e selectinas por receptores glicídicos. Assim, investigou-se o possível efeito pró-inflamatório das lectinas de sementes de *Dioclea violacea* (DvL; PM 100,2 kDa; ligadora de glicose-manose) e de *Vatairea macrocarpa* (Vmac; PM 100 kDa; ligadora de galactose) sobre a migração de neutrófilos (MN) [(*in vivo* e *in vitro*)] bem como o papel de células residentes e os mecanismos envolvidos. Os modelos utilizados foram: peritonite, edema de pata e bolsa de ar subcutânea (*in vivo*) e quimiotaxia de neutrófilos e cultura de macrófagos e células esplênicas no estudo *in vitro*. Foi verificado que as duas lectinas são pró-inflamatórias em todos os estudos realizados *in vivo*. A depleção de células residentes pela lavagem da cavidade peritoneal reduziu de forma significativa a MN induzida pelas duas lectinas. O aumento do número de macrófagos através do pré-tratamento dos animais com tioglicolato potenciou a MN induzida por Vmac, mas não modificou a da DvL. Por outro lado, a depleção de mastócitos através do pré-tratamento com o composto 48/80 não interferiu na MN de nenhuma das lectinas. Sendo assim sugerido o envolvimento de macrófagos e descartado o de mastócitos. Na modulação farmacológica feita através do pré-tratamento dos animais com drogas anti-inflamatórias, observou-se que dexametasona e talidomida, mas não indometacina, MK-886 e BN50730, inibiram a MN induzida pela DvL e Vmac no modelo de peritonite. As duas lectinas não foram hábeis em induzir quimiotaxia *in vitro*, entretanto, Vmac quando incubada com macrófagos induziu a liberação de uma substância quimiotática para neutrófilos com PM >5 kDa e que teve sua atividade inibida por dexametasona (DEXA) e anticorpo anti-TNF- $\alpha$ , sugerindo o envolvimento desta citocina neste efeito. Células esplênicas totais em cultura estimulados com DvL liberaram uma substância quimiotática para neutrófilos com PM > 5 kDa. A MN induzida por esta substância foi inibida por DEXA e os anticorpos anti-TNF- $\alpha$  e anti-IL-1, apontando uma possível participação destas duas citocinas na MN induzida por DvL. O edema de pata induzido por DvL e Vmac foi inibido em animais leucopênicos. A sugestão do envolvimento de leucócitos neste efeito foi corroborada com o histopatológico das patas que mostrou infiltrado celular. O  $\alpha$ -metilmanosídeo e a  $\alpha$ -D-galactose inibem a MN induzida, respectivamente por DvL e Vmac. Desta forma, parece que DvL e Vmac apesar de induzirem MN por diferentes mecanismos, desencadeiam a resposta inflamatória através da interação de seus domínios lectínicos com açúcares presentes na membrana de macrófagos. Para que esta interação resulte numa resposta inflamatória é necessário a manutenção da estrutura terciária das duas lectinas bem como dos sítios de ligação a metais presentes na DvL.

## ABSTRACT

The lectins are proteins that possess at least a carbohydrate-binding site. For this reason, they are capable of interacting with cells and exhibit a variety of biological activities. In previous studies, it was demonstrated that the antiinflammatory activity of some plant lectins is probably due to a competitive blockade of a common leukocyte and/or endothelial selectin carbohydrate ligand. Thus we have investigated possible pro-inflammatory activity of lectins from seeds of *Dioclea violacea* (DvL; MW 100,2 kDa; glucose-mannose-binding) and *Vatairea macrocarpa* (Vmac; MW 100 kDa; galactose-binding) upon neutrophil migration (NM), *in vivo* and *in vitro*, as well as the role of resident peritoneal cells and the underlying mechanisms. The following models were used *in vivo*: peritonitis, paw edema and air pouch. Neutrophil chemotactic gradient, cultured macrophages and splenocytes were used *in vitro*. It was verified that the two lectins exhibit pro-inflammatory activity in all the *in vivo* models. The depletion of resident cells through the washing of the peritoneal cavity reduced the NM induced by two lectins. The increase of macrophages by treatment with thioglycollate potentiated the NM by Vmac but it had no effect on that induced by DvL. On the other hand, the mast cell depletion by treatment with compound 48/80 had no effect on NM induced by DvL or Vmac. This suggests macrophage involvement and discards it of mast cells. In the pharmacological modulation using antiinflammatory drugs, it was observed that dexamethasone (DEXA) and thalidomide, but not indomethacin, MK-886 and BN50730, inhibited NM induced by DvL and Vmac in the peritonitis model. The two lectins did not induce neutrophil chemotaxis *in vitro*, however, when Vmac was incubated with macrophages it induced the release of a neutrophil chemotactic substance (MW > 5 kDa). This substance had its activity inhibited by DEXA and antibodies against TNF- $\alpha$ , suggesting the involvement of this cytokine in this effect. Cultured splenocytes with DvL release a neutrophil chemotactic substance (MW > 5 kDa) which was inhibited by DEXA and antibodies against TNF- $\alpha$  and IL-1, suggesting a possible participation of these two cytokines in NM induced by DvL. The paw edema induced by DvL and Vmac was inhibited in leucopenic animals. The suggestion of leucocyte involvement in this effect is corroborated by the histopathological analysis of rat paws which showed cell infiltration. Methylmannoside and D-galactose inhibited the NM induced by DvL and Vmac, respectively. It seems that although DvL and Vmac induce NM by different mechanisms, the inflammatory response is mediated by interaction of their lectin domains with sugars on the macrophage membranes. For this interaction to result in an inflammatory response the maintenance of the three dimensional structures of the two lectins is necessary as well as the specific metal-binding sites present in DvL.

## I INTRODUÇÃO

### 1. Lectinas

#### 1.1 Definição e Classificação

As lectinas são definidas atualmente como proteínas que possuem pelo menos um sítio de ligação não catalítico, o qual se liga de forma reversível e específica a mono- ou oligossacarídeos, sendo este denominado domínio lectínico (PEUMANS & VAN DAMME, 1995). Apesar de inicialmente terem sido encontradas em vegetais, hoje muitas das lectinas isoladas e caracterizadas provêm, além das plantas, de animais e microorganismos.

Somente após a década de 60, a comunidade científica manifestou interesse pelo estudo destas proteínas. Várias pesquisas foram realizadas e, no presente momento, as lectinas são consideradas como insumos extremamente importantes para a detecção e isolamento de glicoproteínas, bem como na caracterização parcial de seus carboidratos e detecção de mudanças na superfície celular em processos celulares como desenvolvimento, diferenciação e transformações neoplásicas.

Nos últimos anos, o interesse pelo estudo das lectinas tem se intensificado devido principalmente, às evidências de que elas atuam como mediadoras do reconhecimento celular numa grande variedade de sistemas biológicos. O principal exemplo destes fenômenos consiste no envolvimento das lectinas no processo de adesão de vírus, bactérias e protozoários às células do hospedeiro e de leucócitos ao endotélio vascular, criticamente importante na resposta de defesa do organismo contra hospedeiros. (revisado por SHARON & LIS, 1989).

A classificação mais recente para as lectinas esta baseada na estrutura geral destas proteínas e as distribui em quatro grandes grupos: Merolectinas, Hololectinas, Quimerolectinas e Super-lectinas (VAN DAMME *et al.*, 1998)

As Merolectinas consistem de um único domínio lectínico, por isto não possuem a propriedade de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. A Heveína, uma pequena proteína do látex da seringueira, é uma típica merolectina (VAN PARIJS *et al.*, 1991). As Hololectinas são também exclusivamente formadas de domínios lectínicos (no mínimo dois), e por isso, podem aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados, daí serem também conhecidas como “hemaglutininas”. Grande parte das lectinas de plantas pertence a este grupo. As Quimerolectinas possuem, além dos domínios lectínicos, um domínio com atividade catalítica ou outra atividade biológica não dependente dos primeiros. Dependendo do número de sítios de ligação a açúcares, as quimerolectinas se comportam como holo- ou merolectinas. As proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2 (abrina e ricina) são exemplos de quimerolectinas que possuem mais de um domínio lectínico enquanto a classe I das quitinases de plantas são quimerolectinas que se comportam como merolectinas. As Super-lectinas, podem ser consideradas como um grupo especial de quimerolectinas que além dos sítios de ligação a carboidratos, possuem dois domínios estruturalmente e funcionalmente diferentes dos primeiros. A lectina de tulipa ilustra bem esta classe (VAN DAMME *et al.*, 1996).

## **1.2. Interação lectina carboidrato e elicitação de atividades biológicas**

As lectinas são responsáveis pelo reconhecimento de açúcares na superfície de células de bactérias, animais e plantas. Como exemplos, estão algumas toxinas bacterianas, receptores que medeiam a interação célula-célula em animais,

neutralização de patógenos, toxinas de plantas e mitógenos. O estudo do reconhecimento de carboidratos pelas lectinas está bem documentado e a base molecular destas interações tem sido estudada com uma variedade de técnicas biofísicas, incluindo cristalografia em raio-X, ressonância nuclear magnética (RNM), microcalorimetria e mais recentemente, ressonância plasmônica de superfície (RPS). Com o desenvolvimento de novas técnicas de biologia molecular, tem sido estudado também a importância dos aminoácidos envolvidos na ligação lectina-carboidrato (NAGAHORA *et al.*, 1995). Esta interação pode ocorrer com açúcares simples ou complexos.

A possibilidade de que vários eventos envolvidos no reconhecimento celular sejam mediados pela interação entre carboidratos e lectinas tem recebido atenção especial nos últimos anos. Apesar da numerosa diversidade das lectinas, dois aspectos de sua organização devem ser esclarecidos. O primeiro refere-se ao fato de que a atividade de ligação à açúcar é atribuída a uma porção limitada da molécula de lectina, o domínio de reconhecimento de carboidrato ("carbohydrate-recognition domain", CRD). O segundo seria a semelhança entre os CRDs, em relação à seqüência de aminoácidos, que possibilita organizar as lectinas em grupos (DRICKAMER, 1988).

A ligação das lectinas em estruturas glicanas complexas, como os oligossacarídeos de glicoproteínas, é responsável pela especificidade fina das lectinas. Esta ligação é muito mais específica e discrimina lectinas similares em relação a especificidade por monossacarídeos (DEBRAY *et al.*, 1981). A ligação de lectinas multivalentes à açúcares presentes na superfície de células sempre leva à mudanças em receptores lipídicos e glicoprotéicos, elicitando assim uma variedade de respostas biológicas.

Estudos têm demonstrado que na interação de uma lectina com estruturas glicanas complexas presentes em glicoproteínas o sítio de reconhecimento a monossacarídeos tem um papel chave na ligação destas estruturas. Uma única unidade de monossacarídeo é reconhecida pelo sítio de ligação da lectina, enquanto que outras interações não covalentes são estabelecidas (interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio, mediadas por moléculas de água) e desta forma, estabilizam o complexo lectina-ligante (RAMOS *et al.*, 1996a; BOURNE *et al.*, 1992).

Tem sido demonstrado que apesar de apresentarem especificidade bastante semelhante por carboidratos, a afinidade de cada proteína pelo mesmo ligante é, em alguns casos, consideravelmente diferente, sugerindo que algum tipo de diferença estrutural entre as lectinas pode ocasionar diferenças de afinidade em cada complexo estabelecido entre lectina-ligante (CAVADA *et al.*, 2001)

Em adição às lectinas, muitos outros tipos de proteínas interagem com açúcares, entre estas estão as enzimas que têm açúcares como substratos, anticorpos específicos por carboidratos e proteínas transportadoras de membranas. Estas proteínas foram classificadas como proteínas ligadoras de carboidratos tipo I, nas quais os sítios de ligação à açúcares estão em locais profundos e a interação destas com o ligante é de alta afinidade. Em contraste, os sítios de ligação das proteínas ligadoras de açúcar tipo II, incluindo as lectinas, estão expostos na superfície da proteína e a afinidade da ligação é menor em relação as do tipo I. (WEIS & DRICKAMER, 1996)

É importante ressaltar que, independente de suas especificidades por monossacarídeos, as lectinas geralmente apresentam diferenças nas suas estruturas quaternárias. As diferenças espaciais entre os sítios de ligação à carboidratos de diferentes lectinas, combinado com as distâncias entre diferentes

epítomos em ligantes multivalentes são, provavelmente, as razões pelas quais lectinas com especificidades similares por monossacarídeos, exerçam diferentes atividades biológicas. Além disto, estudos de análise estrutural com lectinas têm revelado a importância da multivalência das subunidades como determinantes da atividade biológica destas proteínas, visto que características da ligação podem mudar devido a alterações nos resíduos de monossacarídeos ou na orientação espacial destes (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997).

Devido a sua interação com glicoproteínas presentes nas superfícies celulares, as lectinas estão associadas a diferentes atividades biológicas. A propriedade mais amplamente conhecida das lectinas é sua capacidade de aglutinar eritrócitos de diferentes espécies. Além de eritrócitos, outras células tais como leucócitos e células tumorais, também podem ser aglutinadas por lectinas (BEUTH *et al.*, 1990). Muitas destas proteínas têm sido utilizadas em vários estudos imunológicos, e em alguns casos, estimulam células do sistema imune.

A primeira lectina mitogênica a ser descoberta foi a de *Phaseolus vulgaris* (PHA). Posteriormente, a capacidade de ativar linfócitos foi conferida a outras lectinas e atualmente a concanavalina A (Con-A), purificada de sementes de *Canavalia ensiformis*, o mitógeno "pokeweed" (Pokeweed mitogen, PWM), isolada de *Phytolacca americana*, e a WGA, extraída do germe de trigo, são amplamente utilizadas em diversos ensaios imunológicos, induzindo diferentes efeitos biológicos sobre populações de linfócitos (PEACOCK *et al.*, 1990). Além da atividade estimuladora de linfócitos, as lectinas são capazes de mediar fagocitose em células alvo (NORIN & PINHO, 1986) e ainda induzir atividade citotóxica pelos macrófagos em células tumorais (MacDERMONT *et al.*, 1986).

### 1.3. Lectinas Animais

A interação proteína-carboidrato tem importante papel em dois distintos aspectos da resposta imune. Ela está envolvida tanto no reconhecimento do patógeno quanto na interação celular que leva a neutralização deste. Por outro lado, toxinas bacterianas ou virais podem também atacar células eucarióticas através da interação com carboidratos de superfície. Vale salientar que os componentes proteicos destas interações são lectinas animais.

É crescente o número de lectinas animais identificadas até o presente momento, e uma recente classificação divide estas proteínas em cinco grupos: As **tipo C ou cálcio dependentes** (DRICKAMER, 1988). Incluem-se neste grupo lectinas tais como a proteína ligante de manose (TAYLOR *et al.*, 1989), as selectinas (SPRINGER, 1991), as calnexinas chaperonas (WARE *et al.*, 1995) e as lectinas da superfície das células natural "killer" (BEZOUSKA *et al.*, 1994); as **tipo S** que apresentam ligações dependentes de tióis, sendo denominadas galectinas e mostram especificidade por  $\beta$ -galactosídeos (RINI & LOBSANOV, 1999). Embora as funções deste grupo de lectina animal ainda não estejam bem definidas, existem evidências do possível envolvimento na diferenciação embrionária, adesão e migração celular e na mediação da resposta imune (BARONDES *et al.*, 1994); as lectinas **tipo I**, que apresentam o domínio N-terminal semelhante ao domínio variável das imunoglobulinas, incluídas neste grupo estão as sialoadesinas que apresentam especificidade de ligação por ácido siálico, são encontradas em macrófagos e tem sido proposto para estas proteínas um papel na adesão de linfócitos e desenvolvimento de células mielóides (KELM *et al.*, 1996); as **tipo P** que apresentam receptores para manose-6-fosfato dependentes ou não de cátions

(DRICKAMER & TAYLOR, 1993) e as lectinas **tipo L** que apresentam semelhança com as lectinas de leguminosas (WEIS & DRICKAMER, 1996).

#### 1.4. Lectinas Vegetais

Apesar da ampla distribuição das lectinas, é nos vegetais onde estas proteínas têm sido extensivamente estudadas, não somente pela importância econômica e nutricional de suas espécies, como pela facilidade de seu isolamento.

A despeito de sua abundância nas sementes ou nos bulbos de muitas plantas, a função fisiológica das lectinas ainda permanece um enigma em contraste com as lectinas animais. Algumas funções têm sido propostas para esta proteínas, entre as quais estão: o transporte e estoque de carboidratos nas sementes, ligação de bactérias fixadoras de nitrogênio à raiz, inibição do crescimento de fungos e proteção contra o ataque de insetos. Além disso, a existência de sítios hidrofóbicos na estrutura das lectinas vegetais, os quais interagem com fitohormônios, sugere um possível papel na regulação hormonal do crescimento e desenvolvimento da planta (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997).

Até poucos anos atrás, a classificação geral das lectinas vegetais era dificultada pela falta de relevantes informações em relação à estrutura destas proteínas, porém um rápido progresso no estudo estrutural bem como da clonagem molecular de lectinas, tem possibilitado importantes informações detalhadas na seqüência de uma centena de lectinas vegetais. Estes estudos, permitiram a classificação das lectinas vegetais em sete diferentes famílias: As lectinas de **leguminosas**, lectinas de **monocotiledôneas ligadoras de manose**, lectinas **ligadoras de quitina** e as **RIPs tipo 2**. Estas quatro famílias compreendem o maior número de proteínas. Em contraste, as lectinas de **jaca**, de **amarantina** e de

**Floema de Cucurbitaceace** neste momento são famílias compostas por um número muito pequeno de lectinas (VAN DAMME *et al.*, 1998)

#### 1.4.1. Lectinas de Leguminosas

No reino vegetal, as lectinas de leguminosas têm sido objeto de intensa investigação. Acredita-se que tal direcionamento seja devido à relativamente alta concentração em sementes, a disponibilidade de sementes e grande número de espécies pertencentes a esta família. Os resultados disponíveis hoje na literatura indicam que, apesar das diferenças na especificidade por carboidratos, as lectinas de leguminosas são similares em relação às suas propriedades bioquímicas e físico-químicas e mostram um alto grau de homologia na seqüência de aminoácidos (CAVADA *et al.*, 1993; CAVADA *et al.*, 2001)

Grande parte das lectinas de leguminosas têm sido isoladas em sementes maduras, sendo encontradas, em algumas espécies, mais de uma lectina na mesma semente. Entretanto, a concentração destas é muito baixa nas folhas, no caule e na raiz, sendo abundante na casca de muitas árvores. Além disto, estudos têm indicado que muitas lectinas de sementes de leguminosas são seqüestradas e estocadas nos vacúolos protéicos encontrados em diferentes tecidos vegetativos. (ETZLER, 1986).

Geralmente a atividade de ligação à carboidrato exercida pelas lectinas de leguminosas, depende simultaneamente da presença de cálcio e de íons metálicos. Os sítios de ligação a metais foram inicialmente descritos para a ConA (HARDMAN *et al.*, 1982) e têm sido demonstrados em outras lectinas de forma bem conservados. Os íons, quando ligados a seus sítios, parecem exercer um efeito estabilizador no sítio de ligação a carboidratos. Outro aspecto importante em relação à estrutura molecular das lectinas de leguminosas é a glicosilação que está presente em muitas

destas proteínas. Diferenças no processo de glicosilação resultam na formação de glicoformas, as quais são conhecidas como isolectinas. Protômeros de lectinas de leguminosas contêm também uma cavidade hidrofóbica, primeiramente descrita na ConA por Becker e colaboradores (1975). Esta cavidade consiste, principalmente, de resíduos hidrofóbicos conservados, os quais parecem estar envolvidos na ligação das lectinas com hormônios vegetais (EDELMAN & WANG, 1978).

As lectinas de leguminosas não são interessantes somente pela propriedade de ligação a carboidratos. Estas proteínas, são geralmente formadas de protômeros de aproximadamente 30 kDa, muitos destes consistindo de uma única cadeia polipeptídica composta de aproximadamente 250 resíduos de aminoácidos. Em algumas situações estes protômeros são clivados em dois pequenos polipeptídeos, como é o caso das lectinas da tribo *Viciaeae* (PSA, LCA, LoLI), nas quais cada subunidade é formada por uma cadeia leve  $\alpha$  e uma cadeia pesada  $\beta$

As lectinas de leguminosas na forma nativa são formadas de dois ou quatro protômeros. A formação de dímeros ou tetrâmeros, combinado com a ocorrência ou não de glicosilação, implica na existência de diferentes formas moleculares para estas proteínas. A heterodimerização é comum nas lectinas desta família, originando, assim, estruturas tetraméricas com quatro sítios de ligação à carboidratos. Dados estruturais têm demonstrado que uma unidade monomérica conservada pode se oligomerizar de maneiras variadas, e desta forma, serem usadas no estudo detalhado da interação proteína-proteína (LORIS *et al.*, 1998).

#### 1.4.1.1. Lectina de *Vatairea macrocarpa*

A lectina de sementes de *Vatairea macrocarpa* (Vmac), uma leguminosa da tribo *Dalbergieae*, apresenta-se na forma de um tetrâmero formado por quatro subunidades idênticas de 25 kDa cada, independente do pH. Esta lectina induz aglutinação de hemácias de coelho e de humanos, sendo esta atividade inibida pela galactose, N-acetilgalactosamina e outros açúcares relacionados. (CALVETE *et al.*; 1998).

Investigações anteriores em relação à especificidade de ligação a carboidratos da Vmac, através da inibição da hemaglutinação por sacarídeos ou glicoproteínas, bem como por ressonância plasmônica de superfície, têm demonstrado que a Vmac é uma típica lectina ligadora de Gal/GalNAc (RAMOS *et al.*, 1999). Entretanto, Ramos e colaboradores (2000-a), estudando a especificidade fina desta lectina, através de cromatografia de afinidade de oligossacarídeos e glicoproteínas de estruturas conhecidas, em coluna imobilizada de Vmac, demonstraram que esta lectina reconhece seqüências de N-acetilactosamina não reduzidas. Esta interação parece ser dependente do número de seqüências em cada estrutura glicídica, bem como dependente do pH. Estes achados são importantes e credenciam a Vmac como uma importante ferramenta para o fracionamento e análise estrutural de oligossacarídeos e glicoproteínas de diversas origens e que contêm N-acetilactosamina.

#### 1.4.1.2. Lectina de *Dioclea violacea*

A lectina de sementes de *Dioclea violacea* (DvL), pertencente à família *Leguminosae*, tribo *Phaseoleae* e subtribo *Diocleinae* é uma estrutura multimérica composta de monômeros idênticos de 25,5 kDa, cada um contendo um único sítio de ligação à carboidratos. Cada subunidade também contém sítios de ligação a metais e uma cavidade hidrofóbica (CAVADA, *et al.*, 1993; RAMOS *et al.*, 2000-b). Os aminoácidos dos sítios de ligação a carboidratos e metais bem como da cavidade hidrofóbica, são completamente conservados na estrutura primária das lectinas da subtribo *Diocleinae*.

Como consequência desta homologia na estrutura primária, as lectinas de *Diocleinae* são específicas pelos mesmos monossacarídeos: D-manose/D-glicose. Entretanto, foi demonstrado que estas proteínas diferem em suas especificidades fina, isto é, na especificidade de ligação a oligossacarídeos e glicoproteínas (RAMOS *et al.*, 1996b).

A DvL tem sido utilizada em várias pesquisas e muitas atividades biológicas têm sido demonstradas para esta lectina, entre as quais podemos citar: proliferação de linfócitos humanos e produção de interferon  $\gamma$  *in vitro* (BARRAL-NETO *et al.*, 1992), indução da liberação de histamina por mastócitos peritoneais de ratos (GOMES *et al.*, 1994), inibição do edema de pata e da peritonite induzida por carragenina (ASSREUY *et al.*, 1997), inibição de cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida (ASSREUY *et al.*, 1999) e ativação de linfócitos e apoptose *in vivo* (BARBOSA *et al.*, 2001),

### 1.5. Lectinas como ferramentas no estudo da inflamação

Nos últimos anos, muitos estudos têm sido feitos no sentido de investigar o envolvimento dos carboidratos na resposta inflamatória. Os resultados obtidos evidenciaram a importância da interação proteína-carboidrato, exercendo um papel primordial no processo de adesividade do leucócito à células endoteliais. Neste sentido, várias linhas de pesquisas foram conduzidas com o intuito de utilizar lectinas como ferramentas para o estudo da resposta inflamatória.

Várias lectinas da subtribo *Diocleinae* foram testadas *in vitro* e mostraram ser hábeis em induzir mitose em linfócitos humanos e indução da produção de interferon- $\gamma$  (BARRAL-NETO *et al.*, 1992) além de induzirem a liberação de histamina, a partir de mastócitos peritoneais de ratos (GOMES *et al.*, 1994). Foi demonstrado também que as lectinas de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea grandiflora* e da soja eram capazes de induzir migração de leucócitos e formação de edema de pata em ratos (BENTO *et al.*, 1993). Outros trabalhos, mostraram a indução da produção de óxido nítrico *in vitro* e *in vivo* (ANDRADE *et al.*, 1999), além da indução de apoptose por lectinas vegetais (BARBOSA *et al.*, 2001).

Corroborando com esta idéia, o nosso grupo de pesquisa tem realizado vários estudos utilizando lectinas vegetais e animais, quer seja com a finalidade de inibir ou provocar respostas inflamatórias em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*.

Como resultados desta linha de pesquisa desenvolvida por nós, utilizando para tanto lectinas vegetais, temos: inibição da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos, bem como atividade anti-edematogênica (ASSREUY *et al.*, 1997; ALENCAR *et al.*, 1999) e inibição da cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida em camundongos (ASSREUY *et al.*, 1999).

Além disto, em trabalho mais recente usando uma lectina animal, originada do sêmen de porco, denominada como espermedesina (PSPI/PSPPII), demonstramos que esta lectina, induz migração de neutrófilo através da liberação de uma substância quimiotática liberada por macrófagos, provavelmente  $TNF-\gamma$  e que o mastócito modula de forma negativa esta atividade, possivelmente liberando IL-4 (ASSREUY *et al.*,2001).

## **2. A resposta inflamatória**

A inflamação é uma complexa reação do organismo, em especial dos tecidos vascularizados contra estímulos lesivos. Esta reação serve para destruir, diluir ou imobilizar o agente agressor. Microscopicamente ela envolve uma série de eventos, que incluem: a) dilatação de artérias, capilares e vênulas, com aumento de permeabilidade e fluxo sanguíneo; b) exsudação de fluídos, incluindo proteínas plasmáticas; e c) migração de leucócitos para o foco inflamatório (ROCHA E SILVA, 1978; SEDGWICK & WILLOUGHBY, 1985).

A reação inflamatória é dividida em dois padrões: agudo e crônico. A inflamação aguda é caracterizada pela curta duração, exsudação de fluído e proteínas plasmáticas (eventos vasculares) e migração de leucócitos, predominantemente neutrófilos para o foco inflamatório (eventos celulares), além de alterações sistêmicas tais como dor, febre e elevação nos níveis plasmáticos de uma série de proteínas caracterizadas em conjunto como proteínas de fase aguda. (BAUHMANN & GAULDIE, 1994).

A fase crônica está na dependência do processo ser ou não resolvido, isto é, da eliminação do estímulo durante a fase aguda. Esta fase, em geral, é de longa duração e se caracteriza pela presença de linfócitos e macrófagos, com proliferação

de vasos sangüíneos e de tecido conjuntivo. Quando o processo inflamatório persiste, pode ocorrer um estado patológico e conseqüentemente ser deletério para o hospedeiro e a sua expressão clínica depende tanto do sítio da lesão como da natureza inflamatória celular (BROIDE, 1991)

## **2.1. Eventos celulares da resposta inflamatória**

Uma resposta efetiva do hospedeiro à infecção ou dano tecidual requer um acúmulo local de leucócitos. Estas células fagocitam agentes lesivos, matam bactérias, degradam tecidos e antígenos estranhos, porém, infelizmente, elas podem prolongar a inflamação e induzir danos teciduais através da liberação de enzimas, mediadores químicos e radicais tóxicos de oxigênio (BEVILACQUA *et al.*, 1994)

As células circulantes no sangue incluem neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos, basófilos e plaquetas. As células do tecido conjuntivo são: os mastócitos, que circundam intimamente os vasos sangüíneos; os fibroblastos do tecido conjuntivo; macrófagos e linfócitos residentes ocasionais. Os neutrófilos são essenciais na resposta imune, são abundantes no sangue mas, na ausência de infecção ou outro dano tecidual, eles estão ausentes nos tecidos. A inflamação gera fatores que são quimiotáticos para neutrófilos, resultando em sua migração do sangue e acúmulo no foco inflamatório (ROBBINS *et al.*, 1994).

Inicialmente pensava-se que o recrutamento de leucócitos para o foco inflamatório representava um processo ativo, que era monitorado somente pelo próprio leucócito ou ainda, que seria um processo dependente de propriedades da parede vascular (METCHNIKOFF citado por WALZOG & GAEHTGENS, 2000). A identificação de moléculas com propriedades adesivas envolvidas neste processo mostrou que a migração de leucócitos para um tecido inflamado depende de uma

sofisticada interação entre estas células e as células endoteliais, na qual ambas contribuem ativamente através da expressão em suas superfícies de proteínas adesivas, denominadas como moléculas de adesão além da secreção de mediadores solúveis (McEVER, 1992)

## **2.2. Papel das moléculas de adesão**

Os eventos envolvidos na jornada dos leucócitos do sangue para o foco de inflamação, são em grande parte dependentes da ligação entre moléculas de adesão complementares nos leucócitos e nas superfícies endoteliais, e os mediadores químicos afetam este processo modulando a expressão superficial ou a avidéz destas moléculas adesivas. Os receptores de adesão envolvidos na resposta inflamatória celular pertencem a diferentes famílias de moléculas, incluindo as selectinas, as imunoglobulinas e as integrinas.

As selectinas se caracterizam pela presença de um domínio lecitínico que interage com carboidratos ligantes presentes nos leucócitos e nas células endoteliais, participam de forma efetiva no processo de rolamento do leucócito no endotélio vascular. São formadas por três membros: L-selectina (LAM-1: "Leukocyte Adhesion Molecule-1) normalmente expressa na superfície de todos os leucócitos circulantes, embora seus ligantes (P-selectina, E-selectina e GlyCAM, CD14 e MAdCAM) estejam presentes somente no endotélio ativado (TEDDER *et al.*, 1995); a P-selectina (GMP-140) expressa por plaquetas e células endoteliais estimuladas por substâncias como a trombina, histamina, endotoxina e citocinas, podendo haver variações na expressão frente aos estímulos quando em diferentes espécies animais (EPPIHIMER, *et al.*, 1996; PAN *et al.*, 1998). A E-selectina (ELAM-1: "Endothelial

Leukocyte Adhesion Molecule-1”) tem sua expressão confinada ao endotélio vascular e pode ser controlada pela IL-1, TNF- $\alpha$  e endotoxina (FRIES *et al.*, 1993).

Cinco membros da superfamília das imunoglobulinas atuam como moléculas de adesão: ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, PECAM-1 e Mad-CAM-1. São normalmente encontradas na superfície das células endoteliais, porém, sua expressão pode ser significativamente aumentada pela ativação do endotélio por citocinas ou endotoxinas (PANÉS *et al.*, 1999). Seus ligantes são as  $\beta$ -integrinas (LFA-1, Mac-1 e p150), expressas na superfície dos leucócitos. A interação integrina-imunoglobulina favorece a firme adesão do leucócito ao endotélio (CRONSTEIN & WEISSMAN, 1993).

Utilizando-se várias condições experimentais, tem sido proposto que os diversos eventos envolvidos na migração celular seguem basicamente os seguintes passos (**figura 1**) : 1) marginação e captura dos leucócitos circulantes; 2) adesão rápida e frouxa que responde pela rolagem do leucócito no endotélio “rolling” e que envolve basicamente a P e L-selectinas; 3) ativação dos leucócitos por agentes produzidos pelo endotélio ou outras células, no sentido de aumentar a avidéz de suas integrinas; 4) Ligação firme e estável do leucócito ao endotélio, em grande parte através da via  $\beta$ -integrina-imunoglobulina e, finalmente, após a transmigração pelo endotélio o leucócito através de um movimento celular dirigido (quimiotaxia) locomove-se em direção ao foco da inflamação (SPRINGER , 1994).

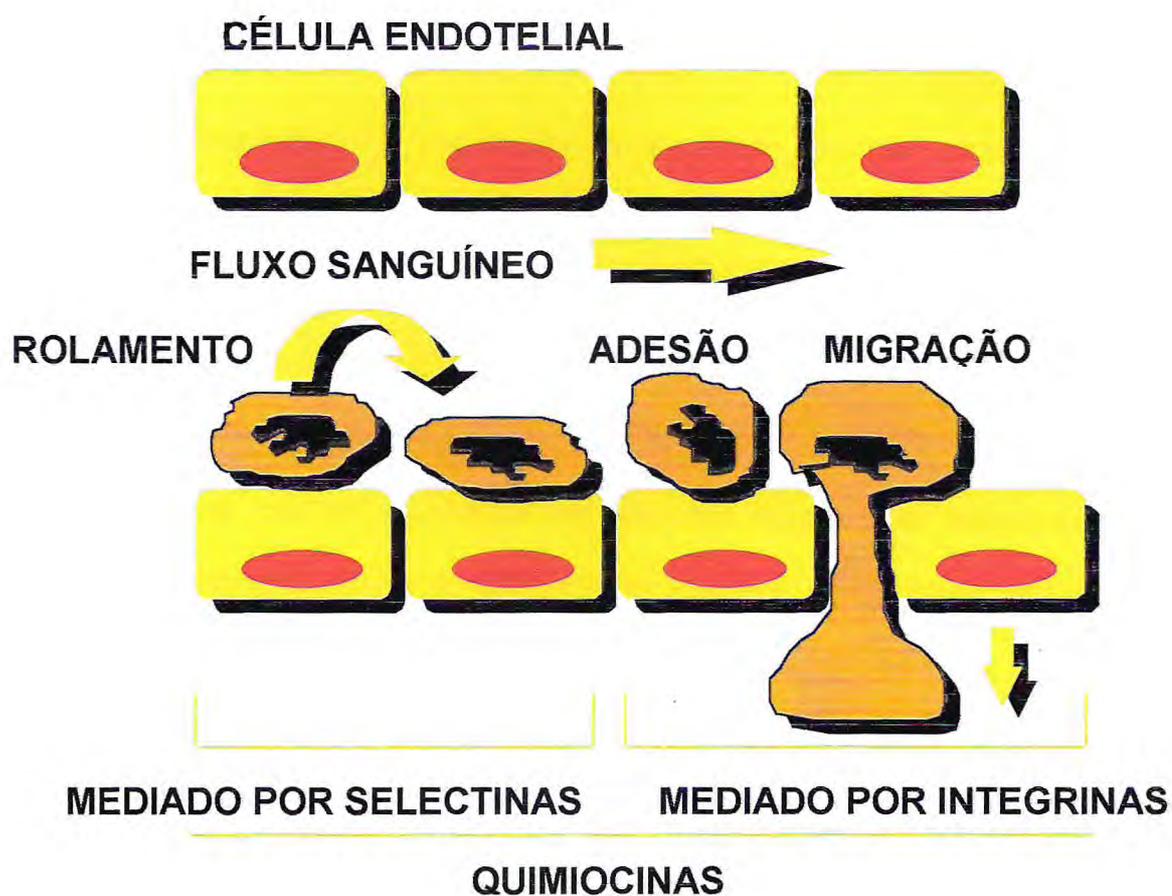


Figura 1. Etapas da migração de neutrófilos

Por fim, o deslocamento do leucócito é dependente de uma variedade de proteínas quimiotáticas que além de direcionarem a migração do leucócito para o tecido inflamado, podem induzir outras respostas como a produção de metabólitos do ácido araquidônico, degranulação e secreção de enzimas lisossômicas e modulação das moléculas de adesão leucocitária. (SPRINGER, 1994). Dependendo do estímulo inflamatório, da população de leucócitos recrutada, do tecido e do contexto de ativação, diferentes moléculas de adesão e mediadores inflamatórios podem estar envolvidos.

### **2.3. Células inflamatórias: Estrutura e Função**

Embora as células envolvidas na resposta inflamatória sejam diferentes quanto à morfologia, ao conteúdo de mediador liberado, ao estímulo para ativação celular e ao curso de tempo para liberação do mediador, elas têm muitas características em comum, como a presença de receptores, estocagem de enzimas hidrolíticas, geração de metabólitos do ácido araquidônico e a capacidade de fagocitar e secretar.

No intuito de definir os papéis exatos desempenhados por diferentes tipos celulares na inflamação, importantes progressos têm sido feitos na caracterização da estrutura e da função de populações purificadas de várias células inflamatórias. Entretanto, o ambiente local em tecidos inflamados representa um meio complexo, no qual muitas células inflamatórias diferentes e proteínas séricas estão presentes, levantando a possibilidade de importantes efeitos moduladores, que não são reconhecidos quando se estudam apenas populações celulares puras. Apesar da complexidade das respostas inflamatórias, parece que há considerável coordenação e cooperação entre diferentes tipos celulares. Porém, estudos que caracterizem de

forma mais profunda as várias células inflamatórias e seus subtipos, contribuirão para melhorar o entendimento das complexas interações envolvidas na inflamação celular.

### **2.3.1. Neutrófilos**

Os neutrófilos polimorfonucleares são os leucócitos predominantes na circulação, onde têm uma existência curta entre sua formação, na medula óssea, e suas subseqüentes atividades fagocíticas e microbicidas nos locais de inflamação, através de um potente arsenal de enzimas digestivas secretadas por seus grânulos citoplasmáticos. A proliferação e diferenciação de células progenitoras de neutrófilos, são reguladas por fatores glicoprotéicos (G-CSF, GM-CSF e IL-3). As células maduras antes de caírem na circulação, permanecem estocadas na medula por aproximadamente 5 dias. Após este período, milhões destas células, entram e saem da circulação, diariamente, sob condições normais. Esta enorme reciclagem pode aumentar bastante durante uma infecção aguda.

Grande parte dos neutrófilos do sangue periférico possuem receptores de superfície para IgG e da IgA, podendo ligar-se a complexos antígeno-anticorpos ou a partículas cobertas por estas imunoglobulinas. Além dos receptores para imunoglobulinas, os neutrófilos contêm também receptores para fMLP, LTB<sub>4</sub>, GM-CSF e para C5a e C3a (SKLAR, 1986).

Existe um grande número de fatores quimiotáticos que podem recrutar neutrófilos para os locais da inflamação tecidual. Entre estes, os mais bem caracterizados são o fMLP, C5a, PAF, LTB<sub>4</sub> citocinas como a IL-8 e as quimiocinas. Em concentrações nanomolares destas substâncias, os neutrófilos respondem por um aumento da adesividade, do número de receptores para estes fatores e da

liberação de substâncias oxidativas pelos grânulos citoplasmáticos (MURPHY, 1994).

Morfológicamente indistinguíveis, os neutrófilos circulantes são heterogêneos quanto à densidade, aos antígenos de superfície celular e às propriedades funcionais. A origem e o significado dessa heterogeneidade é, no momento, desconhecida. São necessários estudos mais detalhados para estabelecer se a evidência da heterogeneidade do neutrófilo reflete células primordiais distintas ou representa diferenças funcionais de maturação dentro de uma linhagem celular comum.

### **2.3.2. Mastócitos , Basófilos e Eosinófilos**

Ambos os tipos são células da série granulocítica derivadas de células progenitoras hematopoiéticas (CD34<sup>+</sup>) da medula óssea. Os basófilos são granulócitos circulantes que se diferenciaram por completo, sendo os mais raros no sangue humano, podendo infiltrar os locais envolvidos em vários processos imunológicos ou inflamatórios, associados com frequência aos eosinófilos, porém, sempre em quantidades inferiores a estes. Por outro lado, os mastócitos maduros normalmente não circulam no sangue. A maturação destas células ocorre em grande quantidade nos tecidos periféricos vascularizados, sendo que seus valores basais nestes tecidos podem sofrer variações significativas em resposta a algumas reações inflamatórias ou imunológicas. Os basófilos e mastócitos contêm ou elaboram, sob estímulos adequados, grande variedade de mediadores biologicamente ativos e potentes. Alguns destes são armazenados em estados pré-formados nos grânulos citoplasmáticos, entre estes incluem-se proteoglicanos, proteases, histamina e carboxipeptidase A (COSTA & GALLI, 1998 ; SCHWARTZ & HUFF, 1993). Estas

células após serem estimuladas, podem iniciar também a síntese de substâncias que exercem importantes e potentes atividades inflamatórias, particularmente os metabólitos do ácido araquidônico formados pela cicloxigenase e lipoxigenase, as quais originam como principais produtos a prostaglandina D (PGD<sub>2</sub>) e os leucotrienos respectivamente (HOLGATE *et al.*, 1993). As citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, TNF- $\alpha$ ) constituem o grupo de mediadores produzidos por mastócitos e basófilos, mais recentemente identificado, e pelo menos o TNF- $\alpha$  pode ser pré-formado e armazenado (GORDON & GALY, 1990).

Normalmente, cerca de 3% dos leucócitos circulantes corresponde aos eosinófilos. Entretanto, estas células estão em quantidades abundantes nos tecidos periféricos, principalmente nas superfícies mucosas dos tratos respiratórios, gastrointestinal e geniturinário inferior; através de receptores para IgA, desenvolvem IgA secretória nestes tecidos. Entre os mediadores lipídicos produzidos pelos eosinófilos, estão o PAF, leucotrienos e lipoxinas (COSTA *et al.*, 1997)). Nos últimos anos, o reconhecimento de que estas células constituem fonte potencial de citocinas sugeriu que os eosinófilos podem influenciar as reações inflamatórias e outras respostas biológicas por meio de mecanismos mais amplos (DESREUMAUX & CAPRON, 1996).

### **2.3.3. Macrófagos**

As células do sistema mononuclear fagocítico incluem pró-monócito e seus precursores na medula óssea, monócitos na circulação e macrófagos teciduais. Monócitos maduros entram na circulação e uma proporção sai do sangue e se desenvolve em macrófagos residentes em praticamente todos os tecidos do

organismo (VAN FURTH,1988). Entretanto, estas células podem apresentar diferenças estruturais e bioquímicas, dependendo do local onde estão localizadas.

Entre as diversas nomenclaturas utilizadas para os macrófagos, citam-se células de Kupffer (no fígado), macrófagos alveolares (pulmões), histiócitos (tecido conjuntivo), osteoclastos (ossos) células de Langerhans (pele), células da micróglia (sistema nervoso central) [(OGLE *et al.*, 1994)].

Os macrófagos são semelhantes aos neutrófilos na sua capacidade fagocítica, nas suas potentes enzimas hidrolíticas e na produção de metabólitos tóxicos do oxigênio. Portanto, compartilham com estes um papel importante na defesa do organismo. O macrófago interage com o meio ambiente através de receptores específicos na membrana, os quais incluem receptores para IgG, IgE, C3b, C3a, M-CSF, GM-CSF, lipoproteínas, peptídeos e polissacarídeos (ADAMS, 1989). A ocupação destes receptores pode provocar a ativação do macrófago, tornando-o mais eficiente, a partir de alterações morfológicas, metabólicas e funcionais.

O macrófago é uma célula secretora extraordinariamente ativa, sendo capaz de produzir centenas de substâncias que afetam a resposta inflamatória, seus produtos de secreção estão direto ou indiretamente envolvidos na inflamação e incluem: enzimas, inibidores enzimáticos, proteínas do sistema complemento, citocinas (IL-8, IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6) e derivados do ácido araquidônico (TAKEMURA & WERB, 1984; WERB *et al.*, 1986; ADANS & KOERNER, 1988).

Na resposta inflamatória os macrófagos têm sido considerados como células de “alarme”, sendo responsáveis pela iniciação da migração dos neutrófilos para o local da injúria. Um argumento consistente com esta idéia foi a demonstração feita por Cunha & Ferreira (1986) que macrófagos em cultura estimulados com LPS

liberavam um fator quimiotático para neutrófilo (MNCF) o qual foi ativo quando testado *in vivo* e *in vitro*. A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos, induzida por estímulos como carragenina, zymosan e endotoxina, aumenta quando se eleva a população de macrófagos residentes, pelo pré-tratamento com tioglicolato e diminuí após a depleção destas células pela lavagem da cavidade (FACCIOLI *et al.*, 1990; RIBEIRO *et al.*, 1990).

É importante ressaltar que os macrófagos também podem desempenhar um importante papel na resolução da inflamação aguda. Além de secretar proteases extracelulares, que ajudam a liqüefazer o exsudato inflamatório residual, o macrófago fagocita restos celulares, exsudato inflamatório e neutrófilos envelhecidos (UNANUE & ALLE, 1987).

#### **2.4. Mediadores Químicos envolvidos no recrutamento de células inflamatórias**

Os eventos moleculares envolvidos na migração de neutrófilos para o foco de lesão se iniciam com a ocupação, por mediadores quimiotáticos, de receptores específicos na membrana celular. Substâncias endógenas e exógenas (fMLP, LPS, carragenina e zymosan) podem agir como agentes quimiotáticos.

Os mediadores endógenos são substâncias oriundas da ativação de células inflamatórias por uma reação imune ou por estimulação direta destas células por citocinas ou substâncias químicas. Muitos destes já foram identificados até o momento, podendo ser originados no plasma, sob a forma de precursores a serem ativados (proteínas do sistema complemento, das cininas e da coagulação) ou sintetizados e armazenados por células (serotonina, histamina, prostaglandinas, PAF, leucotrienos e citocinas). A maioria dos mediadores químicos desempenha sua

atividade biológica através da ligação específica com receptores presentes em células, entretanto alguns podem atuar diretamente como enzimas (proteases lisossomais) ou mediando lesões oxidativas diretas como ocorre com os metabólitos do oxigênio (ROBBINS *et al.*, 1994).

Um grande número de mediadores tem sido implicados no processo de migração dos leucócitos do sangue ao foco de inflamação. Acredita-se que na fase precoce do processo inflamatório induzido por diferentes estímulos, células residentes no tecido, como macrófagos mastócitos e linfócitos, participam no controle da migração de neutrófilos. Este controle é mediado pela liberação destes fatores quimiotáticos.

As prostaglandinas e leucotrienos, produtos enzimáticos oriundos, respectivamente, das vias de cicloxigenação e lipoxigenação do ácido araquidônico (AA) derivado de fosfolípido da membrana celular, são importantes mediadores inflamatórios. A via das cicloxigenases leva a geração de prostaglandinas, entre as quais incluem-se PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub> (protaciclina) e o tromboxano A<sub>2</sub>, que é um importante agregador plaquetário e vasoconstrictor. As prostaglandinas, principalmente a PGE<sub>2</sub> e a protaciclina, são mediadores importantes da vasodilatação inflamatória e potenciam, de modo acentuado, os efeitos quimiotáticos e de aumento da permeabilidade de outros mediadores. Quando o ácido araquidônico é metabolizado pela via da lipoxigenase, dá-se a formação de uma família de compostos denominados leucotrienos: leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>. Enquanto o LTB<sub>4</sub> é um potente agente quimiotático, os outros leucotrienos causam vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (SPRIGER, 1994).

Em geral, os fragmentos maiores formados durante a clivagem dos componentes do complemento tendem a dar continuidade à cascata do

complemento, e os fragmentos menores medeiam aspectos da inflamação. O C5a e o C3a aumentam a permeabilidade vascular e geram vasodilatação através da liberação de histamina dos mastócitos. O C5a ativa também a via da lipoxigenase do AA em neutrófilos e monócitos e intensifica ainda mais a liberação de mediadores inflamatórios. Além disso, aumenta a adesão leucocitária ao endotélio através da ativação dos leucócitos e do aumento da afixação das integrinas. (STITES & TERR, 1992).

O ativador de plaqueta (PAF) é gerado a partir de um fosfolipídio de membrana por ativação de fosfolipases. Tem a capacidade de ativar uma variedade de células, incluindo plaquetas. Este fator pode atuar na degranulação de neutrófilos e eosinófilos, sendo o mais potente quimiotático para eosinófilo já descrito. O PAF gera também um aumento da adesão leucocitária ao endotélio (por estímulo à ligação da integrina aos leucócitos) e da quimiotaxia. Este mediador atua diretamente nas células-alvo através de receptores específicos, mas potencializa também a síntese de outros mediadores, principalmente os metabólitos do AA (WASSERMAN, 1988).

O óxido nítrico (NO) é um gás solúvel, sintetizado a partir da L-arginina, do oxigênio molecular e do NADPH por ação da óxido nítrico sintase, nas células endoteliais e neurônios, onde está presente constitutivamente e pode ser ativado pelo cálcio e calmodulina, ou nos macrófagos, onde sua síntese é induzida por citocinas ou por outros agentes. Muitos estudos têm proposto ao NO um papel regulador no recrutamento de leucócitos (KUBES *et al.*, 1991).

### 2.4.1. Citocinas

As citocinas constituem um grupo heterogêneo de glicoproteínas, sintetizadas e secretadas de modo típico por diversas células, principalmente macrófagos e linfócitos, em resposta à ativação ou lesão. Estas proteínas atuam como sinais modulando as respostas imune e inflamatórias locais ou sistêmicas. Geralmente, células normais precisam ser estimuladas para produzirem citocinas.

Além de serem produzidas por diferentes tipos de células, as citocinas podem exercer seus efeitos em várias outras células, e, devido a essa ação pleiotrópica, desencadeiam diferentes atividades, podendo ser sinérgicas ou antagônicas, ou, ainda, induzir ou inibir a produção de outras citocinas bem como modular a expressão de seus receptores. A IL-6, por exemplo, é uma citocina multifatorial secretada por todas as células quando injuriadas ou ativadas por IL-1 e/ou TNF- $\alpha$ . Por outro lado, citocinas como IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 e IFN- $\alpha$  são eficientes em inibir *in vitro* a síntese de IL-1 e TNF- $\alpha$ . (KLUTH & REES, 1996). Apesar de TNF- $\alpha$  e IL-1 ligarem-se a diferentes receptores, têm sido descritas algumas interações sinérgicas entre estas duas citocinas (NETA *et al.*, 1992).

As citocinas, em geral, são peptídeos ou glicoproteínas com pesos moleculares variando de 6.000 a 60.000 Da. São extremamente potentes, atuam em concentrações milimolares na estimulação de células, após interação específica entre ligante e receptor. Essa alta atividade de especificidade tem facilitado a detecção de citocinas, mas sua produção em pouca quantidade tem dificultado sua purificação. Todavia, o uso de clones celulares que produzem grandes quantidades de um número limitado de citocinas, o desenvolvimento de técnicas de cromatografia de alta resolução, a disponibilidade de anticorpos monoclonais, a purificação por

imunoreatividade e especialmente o uso de técnicas de clonagem têm levado a um grande progresso na caracterização destas proteínas.

#### **2.4.1.1. Citocinas pró-inflamatórias**

Tem sido demonstrado que várias citocinas induzem a migração de leucócitos, principalmente neutrófilos, tanto *in vivo* como *in vitro*, e estão envolvidas em vários eventos da resposta inflamatória. As principais citocinas mediadoras de inflamação são a IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-6, e as quimiocinas, entre as quais estão a IL-8, MIP, MCP-1 e a ENA-78.

##### **a) IL-1**

A interleucina-1 é produzida como duas isoformas (IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) por diversos tipos de células como os macrófagos, linfócitos B e T, fibroblastos, neutrófilos, células endoteliais e células musculares lisas. Em contraste com a IL-1 $\alpha$  que permanece no citoplasma ou é expressa na membrana, a IL-1 $\beta$  pode ser encontrada na circulação (DINARELLO & WOLF, 1993). A IL-1 atua em células alvo através de receptores de alta afinidade (IL-1RI e IL-1RII) não havendo distinção por estes entre a forma  $\alpha$  ou  $\beta$  (LARRICK & KUNKEL, 1988).

Várias substâncias são capazes de induzir a produção de IL-1 em monócitos e macrófagos, incluindo fatores exógenos como as endotoxinas, exotoxinas, hemaglutininas de vírus, protozoários (DURUM & OPPENHEIM, 1989) e substâncias endógenas como C5a, fator estimulador de colônia-1 (CSF-1), TNF- $\alpha$  (DINARELLO *et al.*, 1986) e a própria IL-1 (WARNER *et al.*, 1987).

Muitas são as evidências que apontam a IL-1 como uma citocina de primária e estratégica importância no controle de doenças, particularmente as doenças infecciosas e a inflamação. A IL-1 em culturas de células endoteliais favorece a aderência de leucócitos à superfície do endotélio através da expressão de moléculas de adesão, além de aumentar a produção de mediadores inflamatórios, como as prostaglandinas e o PAF (TATAKIS, 1993).

Ademais, como produto de macrófagos, a IL-1 desempenha importante papel nas reações inflamatórias mediadas imunologicamente, promovendo a proliferação de linfócitos T, aumentando a produção de IL-2 ou a expressão dos receptores para esta citocina, em células T ativadas por antígenos. Além disso, a IL-1 aumenta a capacidade de células apresentadoras de antígenos ativarem as respostas imunes dependentes de células T. (SHIRAKAWA *et al.*, 1986).

#### **b) Fator de necrose tumoral - $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma proteína de 17 kDa, produzida por macrófagos, fibroblastos, linfócitos T e B. Esta citocina possui um largo espectro de ações biológicas em muitas células alvos, imunes ou não. Antes da descoberta do TNF- $\alpha$  foi comprovado a existência de uma outra proteína com peso molecular de 25 kDa, produzida por linfócitos T ativados por mitógenos, que ficou conhecida como linfotóxina (LT) (IRUDDLE, 1994).

Os avanços nos estudos destas duas proteínas possibilitaram a verificação de que o TNF- $\alpha$  e a LT além de apresentarem relativa homologia estrutural, ligavam-se aos mesmos receptores, desencadeando atividades biológicas similares. Com estas descobertas a LT passou a ser denominada como TNF- $\beta$  (BROWNING *et al.*, 1993).

Apesar de muitas outras células serem capazes de produzir TNF- $\alpha$ , os macrófagos representam a principal fonte desta citocina *in vivo*. O mais potente estimulador da biossíntese de TNF- $\alpha$  por macrófagos é o LPS, entretanto outros fatores endógenos como IL-1, IL-2, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, C5a e o próprio TNF- $\alpha$  são também eficientes (OLD, 1985 ; PHILLIP & EPSTEIN, 1986). O TNF- $\beta$  é liberado pelos linfócitos T após ativação com antígenos em associação com componentes do CPH. Altos níveis de IL-2 ou mitógenos não específicos de célula T como a ConA e a PHA (revisado em PAUL & RUDDLE, 1994).

Os efeitos biológicos do TNF- $\alpha$  têm sido estudados em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, sendo consenso geral atribuir-se ao TNF- $\alpha$  a função de mediador chave na inflamação bem como nas respostas invasivas a micróbios, parasitas e neoplasias. Um dos principais efeitos de TNF- $\alpha$  consiste em desencadear a liberação de uma série de outras citocinas, as quais amplificam a atividade deste sozinho. As ações biológicas desta citocina incluem um amplo espectro de efeitos, envolvendo células do sistema imunológico até células participantes do metabolismo.

Muitos são os efeitos elicitados pelo TNF- $\alpha$  nos eventos que envolvem a inflamação, sendo que suas atuações mais importantes nesta patologia correspondem a seus efeitos sobre o endotélio, através da síntese de moléculas de adesão, de outras citocinas (IL-1, IL-8 e IFN- $\gamma$ ), fatores de crescimento (G-CSF e GM-CSF)), prostaglandinas ( $E_2$ ), óxido nítrico e aumento da trombogenicidade de superfície endotelial. A nível de neutrófilo, o TNF- $\alpha$  promove a amplificação das respostas destas células a outros mediadores. Ademais, o TNF- $\alpha$  pode exercer alguns destes efeitos indiretamente, iniciando uma intensa resposta inflamatória com

participação de outros mediadores secundários, como leucotrienos e PAF, além de outras citocinas pró-inflamatórias (BEUTLER & CERAMI, 1988).

Vale salientar a considerável superposição de atividades da IL-1 e TNF- $\alpha$ , resultando em uma espantosa redundância nas comunicações intercelulares. Esta redundância fornece vias alternativas para a mobilização de reações do hospedeiro nas emergências, visto que estas duas citocinas exibem muitas interações sinérgicas. Isso resulta em uma enorme amplificação de efeitos a partir de quantidades relativamente pequenas dessas citocinas.

### **c) Quimiocinas**

As quimiocinas são proteínas homologas de 8 a 10 kDa, subdivididas em diferentes famílias com base na posição relativa de resíduos de cisteína em suas cadeias. Duas destas famílias têm sido extensivamente estudadas. As  $\alpha$  e  $\beta$ -quimiocinas, as quais contêm quatro resíduos de cisteína. Nas  $\alpha$ -quimiocinas (CXC) os dois primeiros resíduos de cisteína são separados por um único aminoácido, enquanto que nas  $\beta$ -quimiocinas (CC) estes resíduos são adjacentes. Além disto, as  $\alpha$ -quimiocinas que contêm a seqüência ácido glutâmico-leucina-arginina, procedendo a seqüência CXC são quimiotáticas para neutrófilos e entre estas citam-se a IL-8, ENA-78 e NAP-2, por outro lado, aquelas que não contêm esta seqüência atuam em linfócitos, entre estas estão a IP-10 e a MIG. As  $\beta$ -quimiocinas, em geral não atuam em neutrófilos mas interagem com monócitos, eosinófilos, basófilos e linfócitos com uma seletividade variável, como exemplo desta família citam-se a MCP-1, 2 e 2 e a Rantes.(DeVRIES *et al.*, 1999).

Entre os papéis biológicos definidos para as quimiocinas estão: 1) efeito quimiotático direto e indireto; 2) promovem a diferenciação e crescimento celular; 3) regulação da hematopoiese e angiogênese; 4) aumentam a adesão e capacidade de ligação dos leucócitos; 5) possível papel no crescimento tumoral e desenvolvimento de metástases ; 6) atividade anti-tumoral (revisado por BEM-BARUCH *et al.*, 1995). A extensiva redundância das atividades exercidas pelas quimiocinas permanece um mistério para ser esclarecido pela ciência através do estudo da interação entre seus receptores (CCRs) e seus ligantes.

As quimiocinas são secretadas nos sítios de inflamação e infecção por células tissulares residentes, leucócitos residentes e recrutados e células endoteliais ativadas por citocinas. O principal estímulo para a produção destas proteínas são citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 e TNF- $\alpha$  e por LPS (BAGGIOLINI *et al.*, 1994) .Em adição, o IFN- $\gamma$  e a IL-4, produtos de linfócitos Th1 e Th2, respectivamente, além de induzirem a produção de quimiocinas, podem estimular a secreção destas através de sinergismo com IL-1 e TNF- $\alpha$  (GARCIA-ZEPEDA *et al.*, 1996).

O aumento na secreção de quimiocinas durante a inflamação resulta no recrutamento seletivo de leucócitos para o tecido inflamado. Os leucócitos mantêm contato com o endotélio através do "rolling" destas células na parede endotelial., processo mediado pelas selectinas. A ativação pelas quimiocinas leva a uma interação de alta afinidade entre integrinas na superfície dos leucócitos e seus ligantes endoteliais. Esta interação, por sua vez, facilita a adesividade do leucócito e seu posterior extravasamento. Entretanto, as quimiocinas para causarem infiltração tissular, sempre atuam em conjunto com outras citocinas, por exemplo, a eotaxina e a IL-5 juntas causam eosinofilia, a IL-5 e a IL-3 induzem a liberação de histamina e

leucotrienos por basófilos, após estimulação com a proteína quimiotática para monócitos (MCP-1) [(BISCHOFF *et al.*, 1990)].

A IL-8 é uma das quimiocinas mais estudada até o momento. Foi originalmente identificada como um fator quimiotático para neutrófilos, produzido por monócitos periféricos ativados com LPS (YOSHIMURA *et al.*, 1987). Ademais, a IL-8 é também quimiotática para linfócitos T, *via* neutrófilos, ou seja, estimulando estas células a liberarem potentes substâncias quimioatrativas para linfócitos T, na presença de mediadores secundários como o TNF- $\alpha$  ou a citocalasina B (BRANDT *et al.*, 1994). Numerosos agentes exógenos e estímulos pró-inflamatórios endógenos, como as endotoxinas, lectinas, hipoxia, viroses, IL-1 TNF- $\alpha$ , estimulam a produção e liberação de IL-8 por uma variedade de células (BEM-BARUCH *et al.*, 1995).

### 3. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Está bem documentado que o reconhecimento é o evento central para desencadear uma variedade de fenômenos biológicos e o primeiro passo em numerosos processos baseados na interação célula-célula, como a fertilização, embriogênese, migração celular e defesa imunológica.

Desde os anos 1970, tornou-se evidente que quase todas as células possuem carboidratos em suas superfícies na forma de glicoproteínas, glicolipídios e polissacarídeos. Em acréscimo a esta informação, os carboidratos têm sido indicados como moléculas que possuem um enorme potencial para codificar informações biológicas (SHARON & LIS, 1989). Além disto, o incremento de métodos analíticos refinados têm revelado uma grande diversidade de estruturas de carboidratos associados com glicoconjugados solúveis ou ligados à superfície. Existem também fortes indicações de que esta diversidade é biologicamente significativa. Assim, em muitos casos, carboidratos modificam a atividade de proteínas com as quais estão ligados.

O fato das lectinas serem capazes de se ligarem de forma específica a resíduos de açúcares crescido ao de que nos últimos anos têm crescido o número destas proteínas estruturalmente bem caracterizadas, credencia as lectinas como importantes ferramentas no estudo dos complexos e multifatoriais caminhos da resposta inflamatória.

Por conseguinte, o objetivo geral desta pesquisa foi estudar os mecanismos e possíveis mediadores químicos envolvidos na resposta inflamatória induzida por duas lectinas vegetais que apresentam diferentes especificidades de ligação à resíduos de açúcares, possibilitando também um estudo comparativo face ao

envolvimento de distintos carboidratos. Para tanto, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

1. Determinar atividade pró-inflamatória das lectinas de sementes de *Dioclea violacea* e de *Vatairea macrocarpa* nos modelos de peritonite, edema de pata e bolsa de ar subcutânea.
2. Verificar se estas lectinas apresentam quimiotaxia para neutrófilos *in vitro*
3. Investigar a possível participação de células residentes na resposta inflamatória provocada por estas proteínas.
4. Verificar a liberação de substâncias quimiotáticas por macrófagos, mastócitos e linfócitos estimulados pelas lectinas, bem como a caracterização parcial destas substâncias.
5. Avaliar o efeito de diferentes bloqueadores farmacológicos sobre a atividade pró-inflamatória das duas lectinas no modelo de peritonite e nos sobrenadantes das culturas de células estimuladas.
6. Investigar o envolvimento do domínio lectínico na atividade pró-inflamatória da DvL e Vmac.
7. Avaliar a importância da estrutura tridimensional das duas lectinas e dos sítios de ligação à metais da DvL na efetuação da resposta inflamatória.

## II. MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) fêmeas com peso entre 150 e 200g. Os animais eram procedentes do Biotério Central do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (UFC). Estes animais receberam ração e água *ad libitum*, sob condições adequadas de luz e temperatura.

### 2. Lectinas

As lectinas de sementes de *Dioclea violacea* (DvL) e *Vatairea macrocarpa* (Vmac) foram isoladas e purificadas no Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMoLab) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC), respectivamente, através de cromatografia de afinidade em Sephadex G-50 e goma de guar (MOREIRA *et al.*, 1996; CALVETE *et al.*, 1998). As pureza das amostras foram avaliadas em SDS-PAGE.

### 3. Materiais utilizados

#### 3.1. Drogas e Reagentes

- Albumina sérica bovina 0,1 % (Sigma)
- $\alpha$ -D-galactose (Merck)
- $\alpha$ -metil-D-manosídeo (Sigma)
- BN 50730 (anti-PAF) – ([3-1,1-dimetil-etil] hexahidro-1,4,4,7 $\beta$ -trihidroxi-8-metil-9H-1,7 $\alpha$  (epoxi-metano) 6 $\alpha$ H-ciclopentano-(c) furo [2,3b] furo [3,2,3,4] ciclopenta [1,2-d] furano-5,9,12 (4H) trione (Instituto Henri Beaufour, Paris)

- Cloreto de Sódio (NaCl, Merck)
- Composto 48/80 (Sigma)
- Dexametasona: ampolas de 2 mL (8 mg/mL) - Decadronal® (Prodome Química e Farmacêutica);
- Dimetil sulfóxido - DMSO® (Sigma)
- Gradiente de Ficoll Hypaque (Sigma)
- Gradiente de Percoll 65% (Sigma)
- N-formil-metil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina (fMLP) (Sigma)
- Heparina 5.000 UI/mL (Roche)
- Indometacina (Prodome Química e Farmacêutica)
- Metil-celulose 0,1 % (Sigma)
- Metrotrexate (Pharmacia)
- MK-886 (inibidor de lipoxigenase) – L-663, 536 (3-[1-(4-clorobenzil)-3-t-butil-tio-5-isopropilindol-2-yl]-2,2-ácido dimetilpropanóico (Merck)
- Sephadex G-50 (Pharmacia)
- Solução de Hanks com soro bovino fetal (Sigma)
- Talidomida (CEME)
- Tioglicolato (Lab Difco Ltda)
- Anticorpos: Os anticorpos anti-TNF- $\alpha$ , anti IL-1 $\beta$  e anti- IL-8, foram produzidos em carneiro, contra as citocinas recombinantes e obtidos do National Institute of Biological Standard and Control – Londres.

A maioria das substâncias foi preparada em solução estéril de NaCl 0,15 M ou água bidestilada. A solução estoque de fMLP ( $10^{-2}$  M) e 10% do volume total da solução de BN 50730 e talidomida, em DMSO. Indometacina (INDO) foi dissolvida

em Tris.HCl pH 8,0, MK-886 em solução de metil-celulose (0,1% em água destilada) e tioglicolato, em água bidestilada, sendo aquecido para sua completa dissolução.

### 3.2. Aparelhos e instrumentos laboratoriais

- Agitador magnético Thermolyne, mod. M37510/26 (DBARNSTEAD)
- Agitador para tubos de ensaio mod. TEO89 (MARCON)
- Alicates para deslocamento cervical
- Autoclave (SOC.FAC)
- Balança para pesagem de animais, mod. ID-1500 (FILIZOLA)
- Balança analítica, mod. AL200 e Ohaus, mod. AS 260D (MARTE)
- Béqueres (SIMAX)
- Câmaras de Neubauer (0,100/0,0025 mm<sup>2</sup>)
- Capela de fluxo laminar (TROX do Brasil Ltda)
- Centrífuga Excelsa Baby I, mod. 206 (FANEM)
- Citocentrífuga, mod. 248 (FANEM)
- Cuba de ultra-som para dissolução e limpeza de material mod. T7 (THORNTON)
- Estufa de CO<sub>2</sub> (NUAIRE)
- Filtro Millipori SW INEX- 13 n.2
- Filtro de polícarbonato (5 µm – Millipore Corp., Bedford, MA)
- Instrumental cirúrgico (pinças, bisturis, tesouras, agulhas, etc.)
- Lâminas e lamínulas para microscopia
- Medidor de pH (pHmetro, MICRONAL)
- Microcâmara de 48 poços (NEUROPROBE Inc. CABIN JOHN, MD)

- Micropipetas automáticas (GILSON)
- Microscópio óptico binocular (EMBRAEME)
- Placa de cultura de 24 poços
- Placa de Petri
- Plestismógrafo (UGO BASILE)
- Sistema AMICON Diaflo ultrafilters (AMICON Division, W.R. Grace & Co. Beverly, MA)

## **4. Modelos Experimentais**

### **4.1. Avaliação da atividade pró-inflamatória das lectinas**

#### **4.1.1. Modelo de peritonite**

Para a avaliação da migração de neutrófilos induzida por DvL ou Vmac, estas foram administradas intraperitonealmente (i.p.). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical ao final de intervalos de tempo que variavam de zero a 96 horas após a injeção das lectinas. Em seguida, as células presentes na cavidade peritoneal foram coletadas através da lavagem desta cavidades injetando-se 10 mL de salina contendo 5 UI/mL de heparina. Os abdomens dos animais foram levemente massageados, e através de uma incisão foram coletados cerca de 7 mL de fluido peritoneal, com pipeta Pasteur de plástico. As contagens total e diferencial dos leucócitos foram realizadas conforme metodologia descrita anteriormente por Souza & Ferreira (1985). Neste procedimento, 20  $\mu$ L do fluido coletado de cada animal foram diluídos em 380  $\mu$ L do reagente de Turk e posteriormente usados para a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer. A contagem diferencial das células foi realizada através de esfregaços corados em lâminas, para tanto, 25  $\mu$ L do exsudato foram centrifugados em citocentrífuga a 400 x g, durante 10 min, após este processo os esfregaços foram corados pelo método da hematoxilina-eosina (corante HEMA 3). A contagem diferencial dos leucócitos foi feita através de microscopia óptica e expressa como a média  $\pm$  E.P.M. do número de neutrófilos/ $\mu$ L do fluido peritoneal e comparados ao valores obtidos no grupo controle do experimento, ou seja, animais que haviam sido injetados somente com salina estéril.

#### **4.1.2. Curva dose-resposta da atividade pró-inflamatória das lectinas de *Dioclea violacea* e *Vatairea macrocarpa***

As lectinas DvL e Vmac foram administradas i.p. em 1mL de salina estéril contendo 100, 200 e 400  $\mu\text{g}$  das proteínas. A avaliação da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi feita 4 horas após a administração das lectinas conforme descrito no item 4.1.1.

#### **4.1.3. Quimiotaxia de neutrófilos *in vitro***

A obtenção de neutrófilos humanos viáveis (90-95% de pureza) foi feita em sangue venoso heparinizado colhido de indivíduos sadios. Os neutrófilos foram isolados por fracionamento em gradiente de Histopaque (Sigma) e em seguida foram suspensos em RPMI 1640 contendo 0,1% de albumina bovina sérica (BSA), de modo a se obter uma suspensão de  $10^6$  neutrófilos/mL. A migração foi avaliada em microcâmara de 48 poços (Neuroprobe Inc. Cabin John, MD). Os dois compartimentos da microcâmara foram separados por membrana de policarbonato (5  $\mu\text{m}$  Milipore Corp., Bedford, MA). Assim, 28  $\mu\text{L}$  do estímulo foi adicionado na parte inferior da câmara e 50  $\mu\text{L}$  da suspensão de neutrófilos ( $10^6$  cels/ mL) na parte superior desta. A câmara foi deixada em incubação por 60 minutos em estufa de  $\text{CO}_2$  e em seguida, o filtro colocado entre os dois compartimentos da câmara foi removido. A porção superior do filtro foi lavada cuidadosamente com PBS com a finalidade de se retirar as células que não migraram. Esse filtro foi fixado em metanol a 70% e corado com a utilização de um corante rápido HEMA 3. Os neutrófilos que migraram foram quantificados por microscopia óptica usando-se objetiva de imersão (aumento de 100 X), a contagem foi feita em cinco campos aleatórios para cada poço de um total de 6 poços por grupo experimental. Em cada experimento RPMI foi

utilizado como controle negativo (migração randômica) e o fMLP como controle positivo de migração.

#### **4.1.4. Bolsa de ar subcutânea (“ Air pouch”)**

O “air pouch” foi produzido na pele do dorso dos animais de acordo com método descrito por Ribeiro e colaboradores (1991). Inicialmente, após depilação do dorso dos animais e assepsia com álcool iodado foram injetados subcutaneamente 20 mL de ar estéril. Três dias após, a cavidade formada foi mantida injetando-se 10 mL de ar. No sexto dia após a injeção inicial de ar os animais foram utilizados para os experimentos de migração.

A avaliação da migração de neutrófilos seguiu-se ao procedimento experimental descrito para o modelo de peritonite (item 4.1.1). As lectinas de DvL (200 $\mu$ g) e Vmac (400 $\mu$ g) foram administradas em 1mL de solução/bolsa. Os animais foram sacrificados seis horas após a injeção das lectinas e a lavagem da cavidade artificial foi feita com 5 mL de salina heparinizada. A migração de neutrófilos para a bolsa de ar foi avaliada pela contagem total e diferencial dos leucócitos. O grupo controle do experimento era constituído por animais que receberam 1mL de salina estéril.

## **4.2. Mudanças na população de células residentes da cavidade peritoneal**

Com o objetivo de investigar se a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos induzida pela DvL e Vmac é um efeito dependente ou não de células residentes, e quais destas células poderiam estar envolvidas nesta resposta, foram realizados os experimentos a seguir:

#### **4.2.1 Lavagem da cavidade peritoneal : depleção de células residentes**

A lavagem da cavidade peritoneal dos animais foi feita seguindo-se a metodologia descrita anteriormente por Souza e colaboradores (1988). Inicialmente, os ratos foram anestesiados com éter etílico e, após assepsia com álcool iodado, foram inseridas três agulhas hipodérmicas na cavidade abdominal, sendo uma próxima ao esterno e duas, na região inguinal. Em seguida, 30 mL de salina estéril foram injetados através da agulha localizada próxima ao esterno. Após massagem na cavidade peritoneal o fluído foi colhido através das agulhas inseridas na região inguinal. Este procedimento foi realizado três vezes, resultando na remoção de mais de 80% da população de mononucleares residentes. Nos animais controle, as agulhas foram inseridas, porém, não houve administração ou retirada de fluído. A população de mononucleares no grupo controle era calculada 30 minutos após a injeção intraperitoneal de 10 mL de salina estéril heparinizada de acordo com a metodologia descrita no modelo de peritonite, sendo os resultados obtidos comparados àqueles que tiveram suas cavidades lavadas.

DvL (200 $\mu$ g/cav.), Vmac (400  $\mu$ g/cav.) e fMLP ( $10 \times 10^{-9}$  moles/cav.) foram administrados i.p. 30 minutos após a lavagem em animais que foram submetidos ou não à depleção de células residentes. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 horas após a injeção das substâncias quimiotáticas e foi comparada ao grupo de animais que recebeu somente salina estéril (Sal).

#### **4.2.2 Pré-tratamento com tioglicolato: incremento da população de macrófagos residentes na cavidade peritoneal**

Tioglicolato (Tg;3% m/v; 10 mL) foi administrado intraperitonealmente e 4 dias após os macrófagos peritoneais foram coletados, contados e comparados com a

contagem obtida em grupo de animais não tratados com Tg (controle), de acordo com a metodologia descrita por Ribeiro e colaboradores (1991).

Dvl (200  $\mu\text{g}/\text{cav.}$ ), Vmac (400  $\mu\text{g}/\text{cav.}$ ) e fMLP ( $10 \times 10^{-9}$  moles/cav.) foram administrados i.p. em animais tratados ou não com tioglicolato. Conforme descrito para o modelo de peritonite, a migração de neutrófilos foi avaliada 4 horas após a injeção dos estímulos, sendo os resultados comparados com os obtidos em animais que receberam somente salina estéril i.p.(Sal).

#### **4.2.3 Pré-tratamento com o composto 48/80: depleção de mastócitos peritoneais**

A depleção de mastócitos da cavidade peritoneal dos animais pelo composto 48/80, foi feita pelo método descrito anteriormente por Di Rosa e colaboradores (1971). Para tanto, os animais foram pré-tratados i.p., durante quatro dias consecutivos, duas vezes ao dia com o composto 48/80. Nos três primeiros dias foi administrado 0,6 mg/Kg do 48/80 e no quarto dia 1,2 mg/Kg. Cinco dias após o início do tratamento a depleção dos mastócitos foi avaliada através da coleta do fluido peritoneal dos animais o qual foi diluído (1:5) em azul de toluidina e a contagem feita em câmara de Neubauer. Os resultados foram comparados àqueles obtidos no grupo de animais não tratados com o composto 48/80. A viabilidade celular foi avaliada observando-se o número de mastócitos íntegros ou degranulados e também pela presença de células contaminantes. Eram descartados fluídos com níveis de contaminação superior a 5%.

DvL (200  $\mu\text{g}/\text{cav.}$ ), Vmac (400  $\mu\text{g}/\text{cav.}$ ) e fMLP ( $10 \times 10^{-9}$  moles/cav.), foram injetados i.p. em animais pré-tratados ou não com o composto 48/80. A migração de

neutrófilos foi quantificada 4 horas após a injeção dos estímulos e os resultados comparados aos respectivos controles.

### **4.3. Modulação farmacológica da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por DvL ou Vmac**

DvL (200 µg/cav.) e Vmac (400 µg/cav.) foram injetadas por via intraperitoneal em 1 mL de salina estéril 1 hora antes da administração da dexametasona (1 mg/Kg; s.c.), talidomida (80 mg/Kg; s.c.) ou do MK-886 (1 mg/Kg; v.o.) e 30 minutos antes da injeção de indometacina (5 mg/Kg; s.c.) ou do BN 50730 (10 mg/Kg; s.c.).

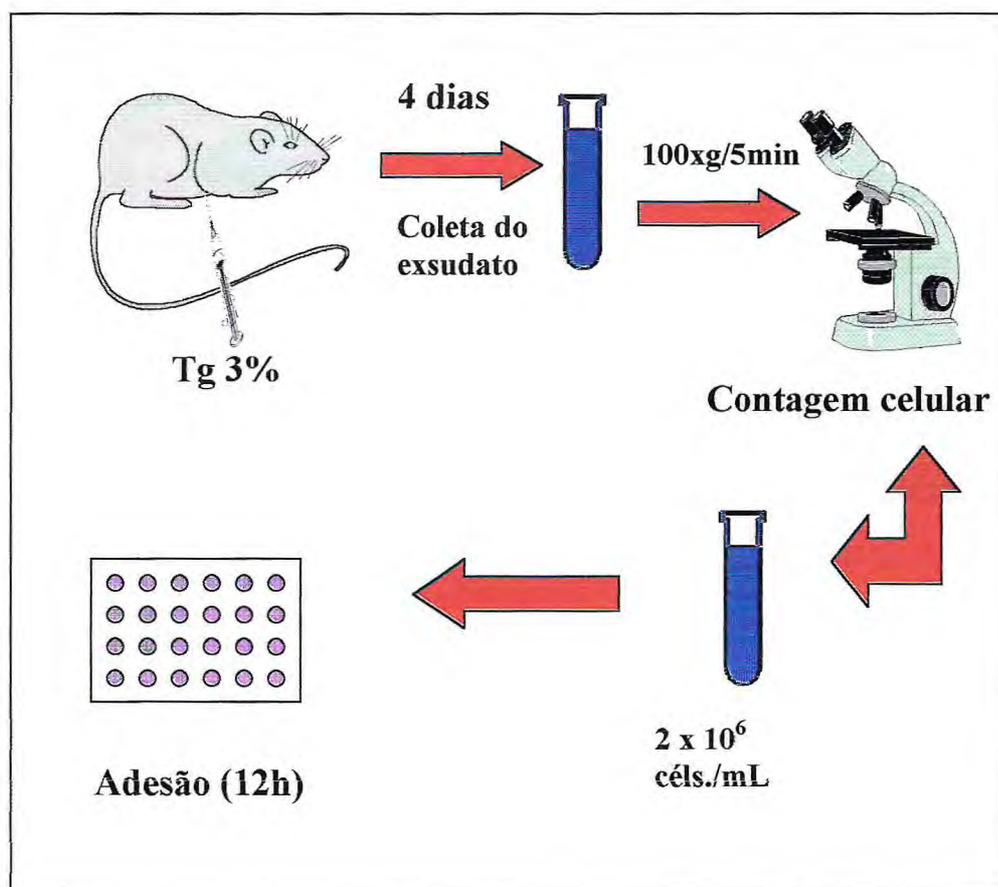
A migração de neutrófilos foi avaliada 4 horas após como descrito anteriormente. Os resultados foram comparados com os do grupo controle positivo de migração (animais tratados i.p. somente com as lectinas) e com o grupo controle negativo (animais que receberam somente salina estéril i.p.).

### **4.4. Cultura de células**

#### **4.4.1. Macrófagos peritoneais**

Macrófagos (MØs) peritoneais foram obtidos de ratos normais inoculados por via intraperitoneal com 10 mL de tioglicolato a 3% em água destilada, seguindo o método descrito por Cunha & Ferreira (1986) **[Figura 2]**. Após quatro dias, os animais foram sacrificados e o exsudato peritoneal era coletado em condições estéreis, após ser injetado 10 mL de RPMI incompleto, pH 7,4, contendo heparina. Em seguida, as células eram lavadas duas vezes em RPMI incompleto por centrifugação a 100 x g durante 5 minutos. O precipitado final foi ressuspensão em 1 mL de RPMI incompleto, sendo então diluído (1:20) em líquido de Turk para contagem total das células em câmara de Neubauer. As células foram ressuspensas

em RPMI incompleto, na concentração de  $2 \times 10^6$  células/ mL e distribuídas em placas de cultura de 24 poços (1mL/poço). Para aderência dos macrófagos na placa esta foi incubada por 1 hora em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%. Após este período o sobrenadante foi descartado e as células aderidas foram lavadas 3 vezes com RPMI incompleto e incubadas por 12 horas em CO<sub>2</sub> a 5%. Para o período de incubação foi adicionado 1mL de RPMI completo em cada poço. Ocorrendo a incubação as células não aderidas eram removidas por três lavagens da placa em RPMI incompleto. A viabilidade celular era então analisada pela adição de azul de tripan em um poço da placa. A análise era feita por microscopia óptica, com base na morfologia celular e impregnação do corante, ou seja, considerava-se viáveis as células com aspecto fluorescente e as inviáveis as que haviam impregnado o corante, portanto coradas de azul.



**Figura 2. Obtenção e manuseio da cultura de macrófagos:** Os ratos foram pré-tratados com tioglicolato (Tg; 3%) 4 dias antes da coleta do exsudato peritoneal com RPMI. Após a lavagem por centrifugação (100 x g /5min), o precipitado era ressuspensão e feita a quantificação dos macrófagos em câmara de Neubauer. A cada poço da placa as células (2 x 10<sup>6</sup> mL) eram aplicados e cultivados em estufa de CO<sub>2</sub> por 12 horas.

#### 4.4.2. Cultura de mastócitos

Para a obtenção de mastócitos, ratos adultos (400 – 500g) foram sacrificados e o fluído peritoneal coletado em condições assépticas através da injeção i.p. de 10 mL de HBSS (pH 7,4) contendo 1% de heparina. Delicadamente, para não romper os mastócitos, o fluído peritoneal era coletado e posteriormente centrifugado a 146 x g durante 7 minutos em 25 °C, em aceleração e desaceleração baixas. O sobrenadante final era descartado e o precipitado ressuspensão em 1mL de HBSS, usando para tanto ponteiros de pontas cortadas. O “pellet” foi lentamente adicionado a um tubo Falcon já pipetado com 5 mL de uma solução contendo 70% de percoll (P-1644; Sigma), 10% de HBSS (g/100 mL de água) 5% de SBF e 15% de água destilada. Foi feita uma centrifugação a 400 x g durante 20 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensão em 10 mL de HBSS, sendo feita então mais uma centrifugação a 146 x g por 7 minutos. Este procedimento foi realizado por três vezes. Finalmente, o precipitado foi ressuspensão em 2 mL de HBSS e a contagem dos mastócitos foi realizada em câmara de Neubauer, diluindo-se o “pellet” final (1:100) em azul de toluidina. Os mastócitos foram ressuspensos em HBSS para uma concentração de  $0,25 \times 10^6$  células/mL/poço (**Figura 3**)

#### 4.4.3. Cultura de células esplênicas totais

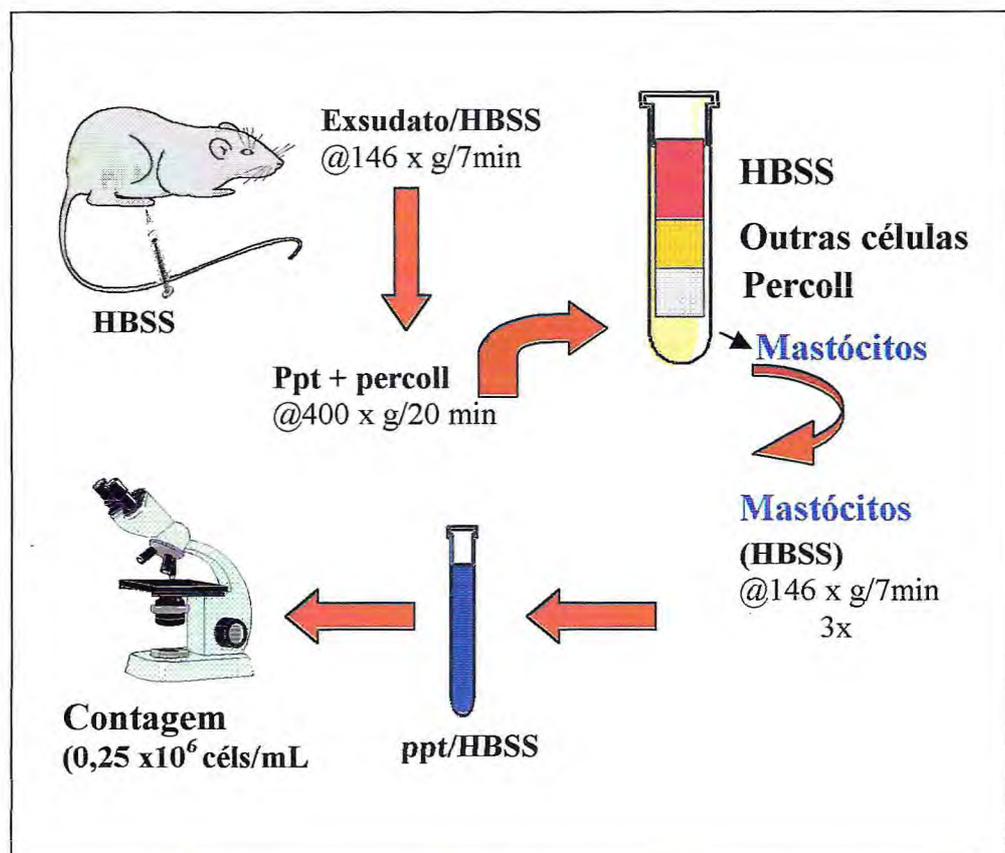
Para obtenção das células esplênicas totais, ratos normais foram sacrificados, o baço coletado e divulsionado com 50 mL de RPMI contendo penicilina (10mL/L). Transferiu-se a parte líquida do masserado do baço para um tubo Falcon, completando-se o volume para 50 mL com RPMI. As células foram lavadas através de duas centrifugações a 250 x g por 10 minutos, usando-se o mesmo volume inicial de RPMI. Em seguida as células esplênicas foram depletadas de hemácias pela

adição de NaCl a 0,2% por 30 segundos e NaCl 1,6%. Após agitação o volume era recuperado para 50 mL com RPMI e novamente centrifugado a 250 x g por 10 minutos. Este procedimento era repetido enquanto se observava a presença de hemácias. O precipitado final foi então ressuspenso em RPMI e a contagem de células feita em câmara de Neubauer diluindo-se o "pellet" (1:100) em solução de Turk, sendo a concentração ajustada de modo a conter  $2 \times 10^6$  células por mL em RPMI. As suspensões celulares foram distribuídas em placas de Petri estéreis (3 mL /placa) e cultivadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 5% por 2 horas. **(Figura 4)**

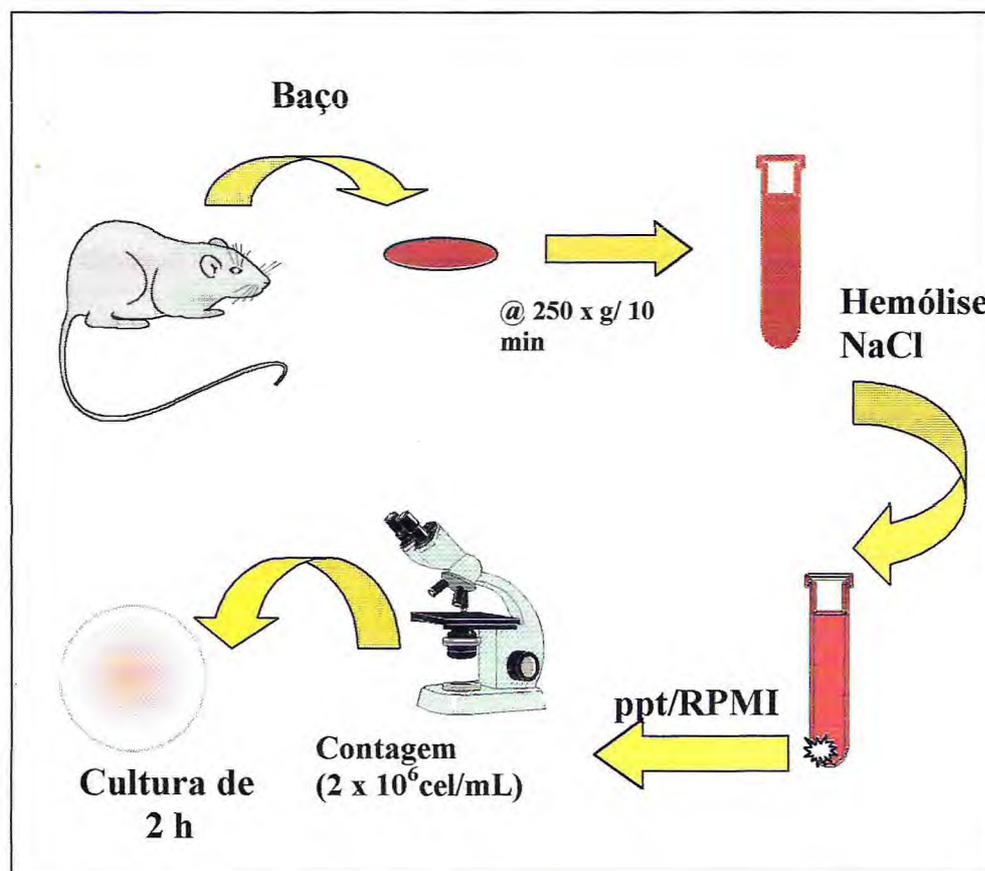
#### **4.4.4. Cultura de células esplênicas aderentes e não aderentes**

As células de baço aderentes (principalmente MØs) e não aderentes foram obtidas após incubação das células esplênicas totais em placa de Petri de acordo com a metodologia descrita no item anterior. Para tanto, após o período de incubação de 2 horas as células não aderentes foram removidas por sucessivas lavagens do sobrenadante com RPMI. O "pool" de sobrenadantes obtidos foi então centrifugado em 1000 r.p.m. por 10 minutos e o precipitado contendo as células não aderidas foi ressuspenso em RPMI. Após contagem das células em Neubauer, diluindo-se o precipitado (1:100) em solução de Turk. O volume foi ajustado para uma concentração de  $10^6$  células não aderidas /mL de RPMI.

Com ajuda de um rodinho de borracha ("cell scraper") de 23 cm (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) as células aderidas foram removidas da placa de Petri e lavadas duas vezes em RPMI. Após contagem a concentração foi ajustada para  $2 \times 10^6$  células aderidas/mL de RPMI e distribuídas em 1 mL em cada orifício de placas de cultura de 24 poços. Finalmente, as células aderidas e não aderida, separadamente, foram cultivadas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub>.



**Figura 3. Isolamento de mastócitos:** O fluido peritoneal era coletado com 10 mL de HBSS (146 x g/7 min) e o precipitado ressuspenseo em 1 mL do meio. A suspensão celular era adicionada a tubos contendo 3 mL de Percoll e centrifugada (400 x g/ 20 min). O precipitado contendo os mastócitos era ressuspenseo em 10 mL de HBSS e centrifugado novamente (146 x g/7 min). Repetia-se o processo 3 vezes e o precipitado final era ressuspenseo em 2 mL de HBSS para a contagem das células.



**Figura 4. Cultura de células esplênicas totais:** Após o sacrifício dos ratos o baço foi retirado e divulsionado com RPMI. A parte líquida foi transferida para um tubo Falcon contendo meio. As células foram lavadas 2 vezes em RPMI através da centrifugação ( $250 \times g/10$  min). Em seguida foi feita a depleção total das hemácias com NaCl e o novo "pellet" centrifugado ( $250 \times g/10$  min). O precipitado final foi ressuspenso em RPMI e as células após serem quantificadas em câmara de Neubauer ( $2 \times 10^6$  cels/mL) foram cultivadas em placa de Petri por 2 h em  $CO_2$ .

#### **4.5. Investigação de atividade quimiotática no sobrenadante da cultura de macrófagos peritoneais estimulados *in vitro* com DvL e Vmac.**

##### **4.5.1 Curva dose resposta**

Os macrófagos peritoneais cultivados como descrito no item 4.4.1 foram incubados com 1 mL de RPMI/poço contendo DvL (25, 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ) ou Vmac (50, 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$ ). O grupo controle foi representado pelos poços contendo somente RPMI. A cultura foi mantida por 1 hora em estufa de  $\text{CO}_2$ . Após esta etapa, para retirada dos estímulos, as células foram lavadas três vezes com o meio. Foram adicionados 1,5 mL de RPMI em cada poço e a cultura foi mais uma vez incubada por 3 horas sob as mesmas condições. No final deste período, os sobrenadantes foram coletados e injetados i.p. (1mL de cada poço/animal) em animais normais. A avaliação da migração de neutrófilos foi feita após 4 horas conforme descrito no item 4.1.1

##### **4.5.2. Curso temporal**

De forma semelhante ao item anterior, DvL (100  $\mu\text{g/mL}$ ) ou Vmac (200  $\mu\text{g/mL}$ ) foram adicionadas à cultura de macrófagos peritoneais. O período de incubação da cultura com os estímulos foi variado em 15, 30 e 60 minutos. Após o término de cada período de incubação os sobrenadantes eram coletados e injetados i.p. (1mL de cada poço/animal) em animais normais. A avaliação da migração de neutrófilos foi feita após 4 horas conforme descrito no item 4.1.1

#### **4.6. Investigação da atividade quimiotática no sobrenadante obtido da cultura de mastócitos estimulados com DvL ou Vmac**

Após serem semeados em placa de cultura (item 4.4.2.), os mastócitos estimulados ou não com DvL (100 µg/mL) ou Vmac (200 µg/mL), foram cultivados durante 60 minutos em estufa de CO<sub>2</sub>. O sobrenadante final foi administrado i.p. em animais normais e a migração de neutrófilos foi então avaliada seguindo-se a metodologia empregada no modelo de peritonite. O grupo controle geral do experimento consistiu dos animais que receberam o sobrenadante de mastócitos não estimulados.

#### **4.7. Investigação de atividade quimiotática no sobrenadante de células de baço totais estimuladas com DvL**

De acordo com a metodologia descrita anteriormente no item 4.4.3. as células de baço totais foram cultivadas e estimuladas com DvL (50, 100 e 200 µg/mL) por um período de 1 hora em estufa de CO<sub>2</sub>. Após este período a cultura foi centrifugada a 1000 r.p.m por 7 minutos para retirada do estímulo e, em seguida incubada novamente por 3 horas nas mesmas condições. Passado este período, o sobrenadante foi coletado após centrifugação da cultura e utilizado para investigação de atividade quimiotática no modelo de peritonite.

#### **4.8. Investigação de atividade quimiotática no sobrenadante de células de baço aderidas e não aderidas estimuladas com DvL**

Células aderentes de baço foram separadas das não aderentes e cultivadas em placa de cultura (item 4.4.4). A cultura foi incubada com DvL (200µg/mL) em CO<sub>2</sub> por 1 hora. Em seguida o sobrenadante foi desprezado e a cultura lavada 3 vezes

com RPMI e incubada novamente por 3 horas. Passado este período, a placa contendo a cultura foi centrifugada a 1000 r.p.m por 7 minutos e o sobrenadante obtido filtrado e utilizado no modelo de peritonite descrito anteriormente.

As células não aderidas na cultura de células de baço após serem separadas das aderidas foram cultivadas em placa de Petri contendo a DvL (200 µg/mL) em CO<sub>2</sub> por 1 hora. Após este período a cultura foi centrifugada a 1000 r.p.m. por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Nova incubação foi feita por 3 horas e após centrifugação da cultura a 1000 r.p.m. por 10 minutos o sobrenadante foi coletado, filtrado e utilizado no modelo de peritonite.

Em uma outra parte das células aderidas, após 1 hora de estimulação com a DvL, foi adicionada a cultura de células não aderidas. Após um período de incubação de 3 horas em CO<sub>2</sub> a cultura foi centrifugada a 1000 r.p.m. e o sobrenadante injetado nos animais.

#### **4.9 Modulação farmacológica dos sobrenadantes das culturas de células que apresentaram atividade quimiotática, quando estimuladas com as lectinas**

##### **4.9.1. Modulação farmacológica *in vivo* da atividade quimiotática do sobrenadante de macrófagos peritoneais estimulados com Vmac**

Macrófagos em cultura foram estimulados com Vmac (200 µg/mL) em CO<sub>2</sub> por 1 hora (ver item 4.4.1). O sobrenadante final foi injetado (1mL, i.p.) em animais pré-tratados ou não com: dexametasona (1 mg/Kg; s.c.) e MK-886 (1 mg/Kg; v.o.) 1 hora antes ou com indometacina (5 mg/Kg; s.c.) 30 minutos antes do tratamento com o sobrenadante da cultura. Os animais controle receberam apenas RPMI i.p. e a

avaliação da migração de neutrófilos foi feita 4 horas após a administração do sobrenadante de macrófagos estimulados com Vmac.

#### **4.9.2. Modulação farmacológica *in vitro* da cultura de macrófagos peritoneais estimulados com Vmac**

Em cultura de macrófagos foi adicionada : dexametasona (10  $\mu$ M), MK-886 (1  $\mu$ M ), indometacina (10  $\mu$ M) ou RPMI. Trinta minutos após a adição das drogas os macrófagos foram estimulados com Vmac (200  $\mu$ g/mL) em CO<sub>2</sub> por 1 hora (ver item 4.4.1). Após a incubação a cultura foi lavada 3 vezes com RPMI e feita nova incubação com as drogas (sem a lectina) nas mesmas concentrações durante 3 horas. Em seguida os sobrenadantes foram colhidos e utilizados no modelo de peritonite. O grupo controle do experimento foi formado com animais que receberam somente o sobrenadante obtido de macrófagos não estimulados.

#### **4.9.3. Modulação farmacológica *in vivo* da atividade quimiotática do sobrenadante de células de esplênicas totais estimuladas com DvL**

Células esplênicas em cultura foram estimulados com DvL (200  $\mu$ g/mL) em CO<sub>2</sub> por 1 hora (ver item 4.4.3). O sobrenadante final foi injetado (1mL, i.p.) em animais pré-tratados ou não com: dexametasona (1 mg/Kg; s.c.) e MK-886 (1 mg/Kg; v.o.) 1 hora antes ou com indometacina (5 mg/Kg; s.c.) 30 minutos antes do tratamento com o sobrenadante da cultura. Os animais controle receberam apenas RPMI i.p. A avaliação da migração de neutrófilos foi feita 4 horas após a administração do sobrenadante das células estimulados com DvL.

#### **4.9.4. Modulação farmacológica *in vitro* da cultura de células esplênicas totais estimuladas com DvL**

À cultura de células totais de baço conforme descrito no item 4.4.3. foi adicionada: dexametasona (10  $\mu$ M), MK-886 (1  $\mu$ M), indometacina (10  $\mu$ M) ou RPMI. Trinta minutos após a adição das drogas as células foram estimuladas com DvL (200  $\mu$ g/mL) por 1 hora em CO<sub>2</sub>. Ao final deste período a cultura foi centrifugada a 1000 r.p.m. por 10 minutos e o sobrenadante desprezado. As células foram lavadas 3 vezes com RPMI e nova incubação foi feita com as drogas nas mesmas concentrações (sem a lectina). Posteriormente, os sobrenadantes foram colhidos e utilizados no modelo de peritonite. O grupo controle do experimento foi formado com animais que receberam somente o sobrenadante obtido de macrófagos não estimulados.

#### **4.10. Efeito do anticorpo anti-TNF- $\alpha$ e anti-IL-8 sobre os sobrenadantes obtidos das cultura de macrófagos estimulados com Vmac ou de células esplênicas totais estimuladas com DvL**

Os sobrenadantes finais das culturas de macrófagos estimulados com Vmac e de células de baço totais, conforme descrito nos itens 4.4.1. e 4.4.3. respectivamente, foram incubados com 50  $\mu$ L dos anti-soros anti-TNF- $\alpha$  e anti-IL-8, 10 minutos antes da administração i.p. em animais normais. A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi feita 4 horas após a injeção dos sobrenadantes. Os resultados foram então comparados àqueles obtidos em animais que haviam recebido somente sobrenadante de células não estimulados.

#### **4.11. Efeito do tratamento *in vivo* com anticorpo anti-TNF- $\alpha$ anti-IL-1 sobre a migração de neutrófilos induzida por DvL e Vmac.**

Os animais foram tratados i.p. com 0,2 mL de solução contendo 30  $\mu$ l do anti-soro anti-TNF- $\alpha$  e anti-IL-1. Cinco minutos após DvL (200  $\mu$ g/cavidade) e Vmac (400  $\mu$ g/cavidade) foram administradas por via intraperitoneal. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 horas após a injeção das lectinas. Os controles positivo de migração receberam apenas as lectinas i.p. e os controles gerais receberam salina estéril i.p.

#### **4.11. Investigação dos pesos moleculares das substâncias quimiotáticas presentes nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais e células esplênicas totais estimuladas, respectivamente com Vmac e DvL**

Os sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais estimulados com Vmac (200  $\mu$ g/mL) e de células de baço totais estimuladas com DvL (200  $\mu$ g/mL) foram filtrados em um sistema Amicon com membrana YM-5. A fração retida foi ressuspensa com RPMI ao volume inicial e injetada i.p. (1 mL/cavidade). A fração filtrada foi também injetada i.p. (1 mL/cavidade). A avaliação da migração de neutrófilos foi feita 4 horas após e os resultados comparados ao grupo controle geral, constituído de animais injetados somente com RPMI e ao grupo controle positivo da migração, no qual os animais receberam o sobrenadante não filtrado das culturas de células estimuladas com Vmac ou DvL.

#### **4.12. Investigação do envolvimento do domínio lectínico na atividade pró-inflamatória da DvL e Vmac.**

As duas lectinas foram testadas nos modelos de peritonite sozinhas (DvL; 200 µg ou Vmac; 400 µg) ou associadas a uma solução de 0,1M de seus açúcares específico (DvL +  $\alpha$ -metil-manosídeo ou Vmac +  $\alpha$ -D-galactose). A avaliação da inibição da migração de neutrófilos para cavidade peritoneal foi feita conforme descrito anteriormente no item 4.1.1. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo injetado somente com salina (Sal) e #  $p < 0,05$  comparado ao grupo com as lectinas sozinhas. ANOVA – Teste de Duncan

#### **4.13. Efeito da desnaturação térmica das lectinas sobre a migração de neutrófilos induzida por DvL ou Vmac**

Para demonstrarmos a importância da estrutura tridimensional das lectinas na atividade pró-inflamatória exercida por elas fizemos a desnaturação das duas proteínas em estudo. Para tanto DvL e Vmac, em solução, foram submetidas a fervura durante 10 minutos. Em seguida as duas lectinas foram testadas no modelo de peritonite, seguindo a metodologia descrita no item 4.1.1. Os resultados obtidos foram comparados àqueles obtidos com as proteínas não desnaturadas.

#### **4.14. Efeito da desmetalização na atividade pró-inflamatória da DvL**

Amostras da DvL foram submetidas à desmetalização através de diálise contra EDTA 5mM, por 18 horas a 4 °C. Após este processo a DvL(200 µg/cavidade) foi administrada na cavidade peritoneal dos animais. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após a injeção da lectina e os resultados foram expressos como a

média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo injetado somente com salina (Sal) e #  $p < 0,05$  comparado ao grupo com a lectina não desmetalizada (não quelada) ANOVA – Teste de Duncan

#### **4.15. Avaliação da atividade pró-inflamatória da DvL e Vmac no modelo de edema de pata**

Os volumes das patas direitas de cada animal foram medidos pletismograficamente antes da injeção subcutânea intraplantar das lectinas em 0,1 mL de salina estéril (DvL, 200  $\mu\text{g/pata}$  e Vmac, 400  $\mu\text{g/pata}$ ), considerando-se este o tempo zero. Os volumes das patas foram medidos 15 e 30 minutos e 1, 2, 3, 4, 8 e 24 horas após a administração das lectinas. O edema foi calculado como variação de volume, ou seja, a diferença entre o volume em um determinado tempo após o estímulo e volume antes do estímulo (tempo 0). As áreas sob as curvas (ASC) também foram calculadas usando o método do trapézio (LANDUCCI *et al.*, 1995). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias e comparados àqueles obtidos das patas dos animais que foram injetados com 0,1 mL de salina em substituição às lectinas.

#### **4.16. Investigação do envolvimento de leucócitos no edema de pata induzido pela DvL ou Vmac**

Com o objetivo de investigar se a resposta edematogênica provocada pela injeção subcutânea intraplantar da DvL ou Vmac ocorreu com envolvimento de leucócitos, foram realizados os seguintes experimentos:

#### **4.16.1. Interferência da leucopenia na indução de edema de pata pelas DvL ou Vmac**

Leucopenia foi induzida nos animais através do pré-tratamento diário, por três dias consecutivos com metotrexate (2,5 mg/Kg; i.p.), seguindo a metodologia descrita por Willoughby & Giroud (1969). O número de leucócitos no sangue periférico após o tratamento foi determinado em amostras de sangue coletados da cauda dos animais, onde foi feita a contagem total e diferencial das células. Os resultados foram comparados àqueles obtidos em animais que não foram submetidos ao tratamento.

Três dias após a última injeção de metotrexate, DvL ou Vmac foram administradas por via subcutânea intraplantar (200 e 400 µg/pata, respectivamente). O edema de pata foi então avaliado conforme descrito no item 4.15. e os resultados comparados aos obtidos no grupo que foi tratado somente com as lectinas na pata.

#### **4.16.2. Análise histopatológica do edema de pata induzido pela DvL ou Vmac**

Os animais foram sacrificados 4 horas após a injeção subcutânea intraplantar de Vmac (400 µg/pata) ou DvL (200 µg/pata). As patas foram removidas, fixadas em formol a 10%, desidratadas, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Os cortes foram montados em lâminas e corados pela técnica da hematoxilina-eosina (HE).

#### **4.17. Análise Estatística**

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. Para a determinação das diferenças estatísticas entre os grupos, os testes utilizados foram: Análise de Variância (ANOVA) e teste de Duncan ou Bonferroni.  $p < 0,05$  foi fixado para indicar significância estatística.

### III RESULTADOS

#### 1 As lectinas de sementes de *Dioclea violacea* (DvL) e *Vatairea macrocarpa* (Vmac) induzem migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de forma dose- e tempo-dependente

A administração intraperitoneal das lectinas de sementes de *Dioclea violacea* (DvL) e *Vatairea macrocarpa* (Vmac) induziu migração de neutrófilos para esta cavidade de forma dose-dependente 4 horas após a injeção (**Fig. 5A e 6A**). A DvL apresentou efeito inflamatório crescente nas doses de 200 e 400  $\mu\text{g}$ /cavidade, sendo observado um aumento respectivo de 125% e 237% da migração de neutrófilos, quando comparado ao grupo de animais controle (Sal). Por outro lado, a eficiência da Vmac em produzir inflamação somente ocorreu quando administrada na maior dose utilizada (400  $\mu\text{g}$ /cavidade), sendo observado nesta dose um aumento de 128%. A partir destes resultados as doses de 200 e 400  $\mu\text{g}$ /cavidade foram determinadas para a DvL e Vmac, respectivamente, nos próximos experimentos.

Com a finalidade de investigar o curso temporal desta atividade pró-inflamatória das lectinas, a migração de neutrófilos foi avaliada 2, 4, 8, 24, 48 e 72 horas após a injeção da DvL e Vmac (**Fig 5B e 6B**). Podemos observar que as duas lectinas induziram aumento significativo do número de neutrófilos no fluído peritoneal já na 2<sup>a</sup> hora e que, os valores máximos foram observados na 4<sup>a</sup> hora. Em relação a DvL, os valores de neutrófilos começaram a declinar na 8<sup>a</sup> hora e voltaram aos valores basais somente na 48<sup>a</sup> hora. Porém, a migração de neutrófilos induzida pela Vmac foi significativa somente até a 8<sup>a</sup> hora após a sua administração.

Foi demonstrado ainda que tanto a DvL como a Vmac induziram migração de mononucleares para a cavidade peritoneal, entretanto com um curso

temporal inverso àquele observado para os neutrófilos, ou seja, a migração de mononucleares induzida pelas duas lectinas iniciava-se quando a de neutrófilos começava a cair (8<sup>a</sup> hora), atingindo um pico máximo na 72<sup>a</sup> hora, onde não existe mais aumento significativo de neutrófilos.

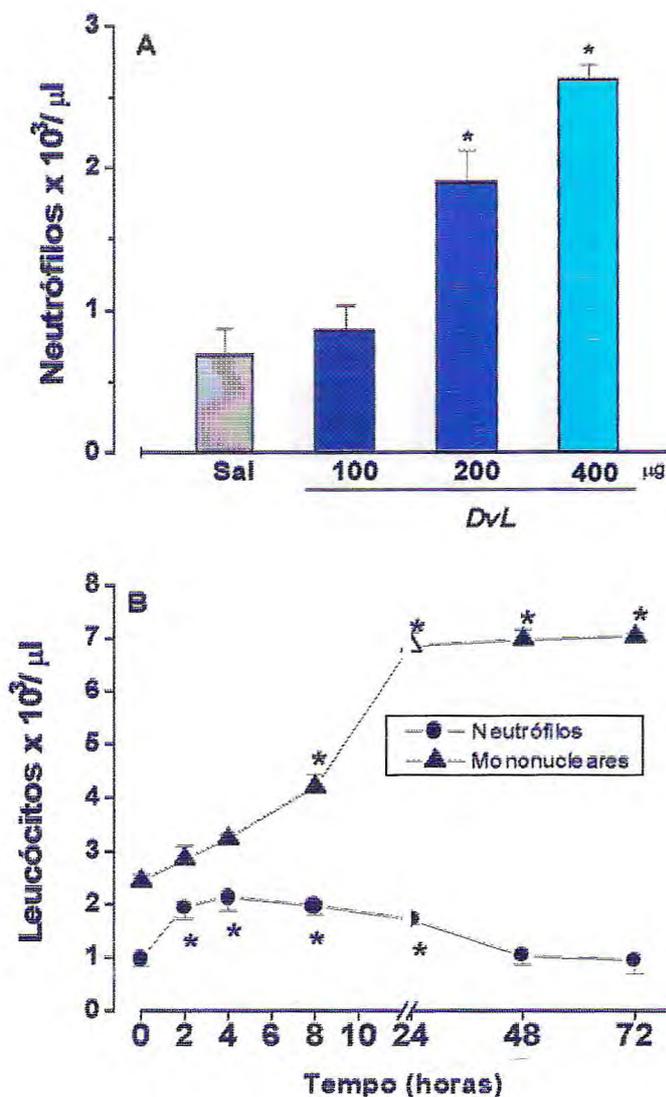


Figura 5. A lectina de *Dioclea violacea* (DvL) induz migração de neutrófilos de forma dose- e tempo dependente. Painel A: Os animais foram tratados i.p. com 1 mL de DvL (100, 200 e 400 μg/ cav). Os animais controle (Sal) receberam o mesmo volume de salina estéril (i.p.). A migração de neutrófilos (MN) foi avaliada 4 h após. Painel B: DvL (200μg/ cav) foi injetada i.p. e a MN determinada 2, 4, 8, 24, e 72 h após. Os valores da migração basal de neutrófilos e de mononucleares do grupo Sal estão representados no tempo zero, por círculos e triângulos, respectivamente. Valores expressos como média ± E.P.M. de 5 animais. \* p < 0,05 comparado ao grupo Sal. ANOVA – Teste de Duncan.

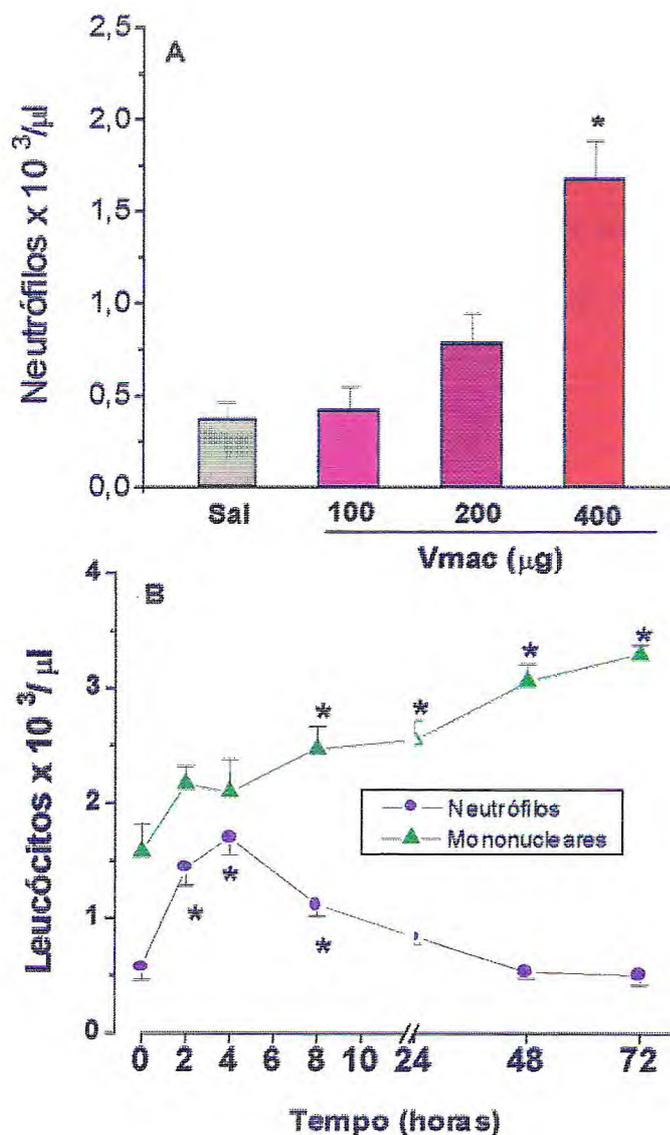


Figura 6. A lectina de *Vatairea macrocarpa* (Vmac) induz migração de neutrófilos de forma dose- e tempo dependente. Painel A: Os animais foram tratados i.p. com 1 mL de Vmac (100, 200 e 400 μg/ cav). Os animais controle (Sal) receberam o mesmo volume de salina estéril (i.p.). A migração de neutrófilos (MN) foi avaliada 4 h após. Painel B: Vmac (400 μg/ cav) foi injetada i.p. e a MN determinada 2, 4, 8, 24, e 72 h após. Os valores da migração basal de neutrófilos e de mononucleares do grupo Sal estão representados no tempo zero, por círculos e triângulos, respectivamente. Valores expressos como média ± E.P.M. de 5 animais. \* p < 0,05 comparado ao grupo Sal. ANOVA – Teste de Duncan.

## **2. DvL e Vmac não induzem quimiotaxia de neutrófilos *in vitro***

Pelos dados apresentados na **figura 7**, as duas lectinas: DvL (25, 50 e 100  $\mu\text{g/poço}$ ) [**Fig.7A**] e Vmac (100, 200 e 400  $\mu\text{g/poço}$ ) [**Fig.7B**], quando incubadas com neutrófilos humanos em microcâmara de 48 poços, não promoveram quimiotaxia para neutrófilos, diferente daquela promovida pelo fMLP ( $10^{-6}$  M), o qual por ser um agente quimiotático direto foi utilizado como controle positivo do experimento.

## **3. Efeito das mudanças na população de células peritoneais residentes na atividade pró-inflamatória da DvL e Vmac**

Com o propósito de estudarmos o envolvimento de células residentes sobre a migração de neutrófilos induzida por DvL ou Vmac, modificamos a população de células residentes (macrófagos e mastócitos) através das seguintes metodologias.

### **3.1. A migração de neutrófilos induzida pela DvL ou Vmac é inibida quando se reduz a população de células residentes.**

Através da lavagem da cavidade peritoneal com salina (L) foi possível reduzir em 90% a quantidade de células residentes, comparado ao controle (C) [**Fig. 8A**]. Como apresentado na **figura 8B**, a migração de neutrófilos induzida pela DvL (200  $\mu\text{g/cavidade}$ ) e Vmac (400  $\mu\text{g/cavidade}$ ) foi reduzida significativamente em 72% e 74% respectivamente, quando comparado aos resultados na cavidade não lavada (-). Diferente do fMLP ( $10 \times 10^{-9}$  moles/cavidade), que por interagir diretamente com o neutrófilo não teve seu efeito alterado pela lavagem. Estes dados somados ao fato de que estas duas lectinas não promovem quimiotaxia *in vitro* são fortes

indicativos para um mecanismo indireto na migração de neutrófilos induzida por elas, ou seja, *via* células residentes.

### **3.2. A migração de neutrófilos da Vmac, mas não da DvL foi potenciada pelo aumento da população de macrófagos residentes.**

A população de macrófagos da cavidade peritoneal foi incrementada em 116% em relação ao grupo controle (C) através do tratamento com tioglicolato (Tg; 3%; i.p.), três dias antes da administração da lectina (**Fig. 9A**). Podemos observar na **figura 9B** que o incremento de macrófagos acarretou um aumento de 79% na migração de neutrófilos induzida pela Vmac (400 µg/cavidade) quando comparado ao seu efeito sem tioglicolato ( - ). Entretanto, da mesma forma que ocorreu com fMLP ( $10 \times 10^{-9}$  moles/cavidade) o efeito quimiotático para neutrófilo induzido pela DvL, não foi alterado pela maior oferta de macrófagos. A partir destes resultados podemos sugerir o envolvimento dos macrófagos na migração de neutrófilos induzida pela Vmac.

### **3.3. Depleção da população de mastócitos não altera a migração de neutrófilos induzida pela DvL ou Vmac**

A depleção de mastócitos residentes na cavidade peritoneal foi de 95% em relação ao grupo controle (C) e ocorreu através do pré-tratamento crônico dos animais com o composto 48/80 (**Fig.10A**). Este procedimento não interferiu de forma significativa na migração de neutrófilos de nenhuma das lectinas utilizadas bem como do fMLP ( $10 \times 10^{-9}$  moles/cavidade). Estes dados são sugestivos de que os mastócitos não estejam envolvidos na quimiotaxia de neutrófilos induzida pela DvL ou Vmac.

#### 4. As lectinas de *D.violacea* e *V.macrocarpa* induzem migração de neutrófilos na cavidade de bolsa de ar subcutânea (“Air pouch”)

O efeito quimiotático para neutrófilos da DvL e Vmac foi observado também no modelo de bolsa de ar subcutânea, no qual se reproduz uma cavidade artificial com predomínio de macrófagos.

Conforme demonstrado na **figura 11**, verificamos que a DvL (200 µg/bolsa) e Vmac (400 µg/bolsa) promovem respectivamente, aumento significativo de 660% e 587% do número de macrófagos em relação ao grupo controle (Sal).

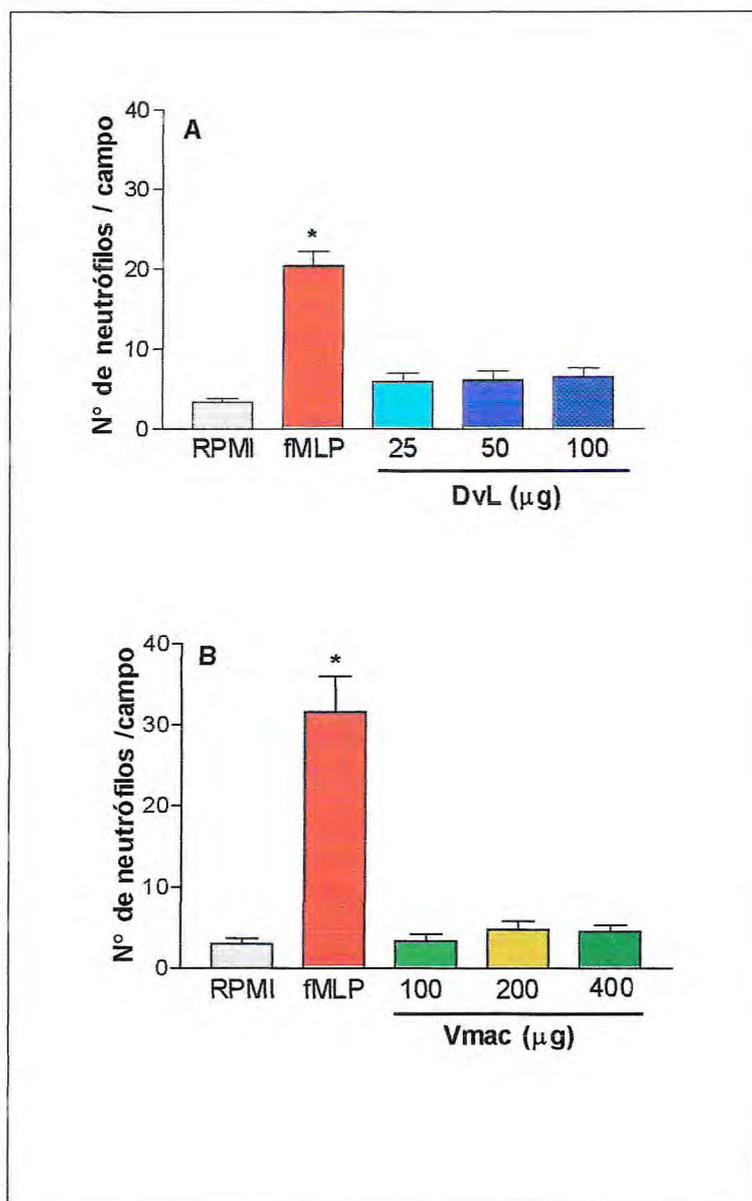


Figura 7. As lectinas de sementes de *Dioclea violacea* (DvL) e *Vatairea macrocarpa* (Vmac) não induzem quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*. Painel A: DvL (25, 50 e 100 µg/mL). Painel B: Vmac (100, 200 e 400 µg/mL), foram utilizadas como agentes quimiotáticos em microcâmaras de 48 poços. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM do nº de neutrófilos por campo, de um total de cinco campos por poço (6 poços por grupo). RPMI e fMLP ( $10^{-6}$  M) foram utilizados respectivamente, como controles negativo e positivo.

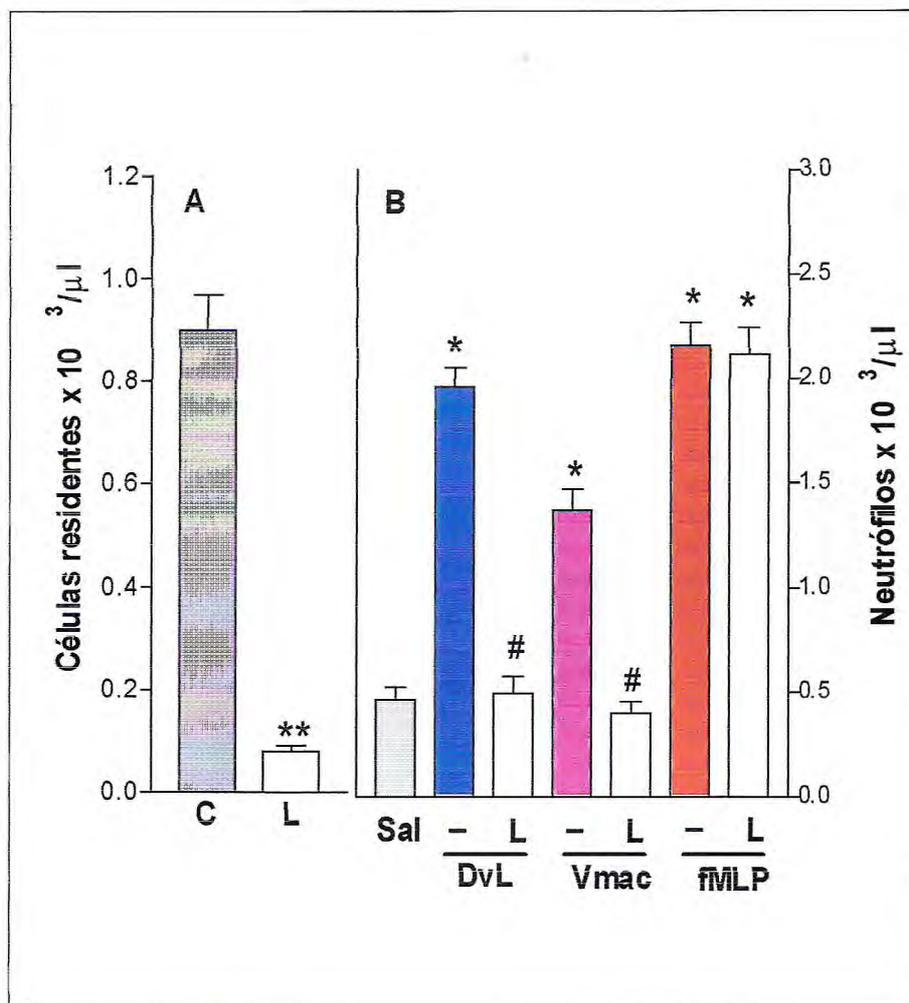


Figura 8. A migração de neutrófilos induzida pelas lectinas de *Dioclea violacea* (DvL) e *Vatairea macrocarpa* (Vmac) é inibida quando a população de células residentes é reduzida, pela lavagem da cavidade peritoneal. Painel A: n° de células residentes nas cavidades não lavadas (C) e lavada (L). Painel B: mostra a migração de neutrófilos (MN) induzida pela DvL (200  $\mu\text{g}/\text{cav.}$ ), Vmac (400  $\mu\text{g}/\text{cav.}$ ) e fMLP ( $10 \times 10^{-9}$  moles/cav.) nas cavidades lavadas (L) e não lavadas (-). A MN foi avaliada 4h após a injeção dos estímulos. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 6 animais. \*\*  $p < 0,05$  comparado ao grupo C; \*  $p < 0,05$  comparado a Sal e #  $p < 0,05$  comparado aos nos quais as lectinas foram injetadas em cavidades não lavadas. ANOVA – Teste de Duncan.

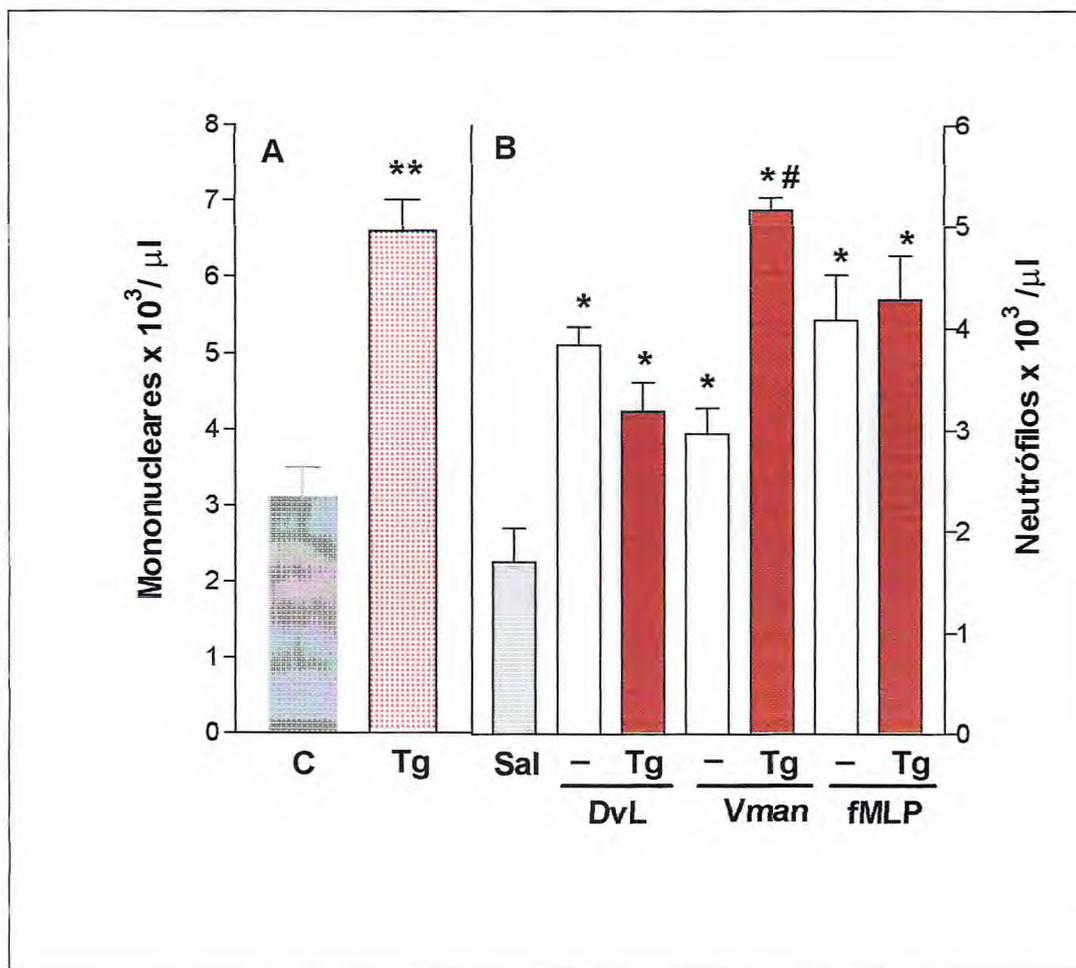


Figura 9. O aumento da população de macrófagos na cavidade peritoneal potencia a migração de neutrófilos induzida pela lectina de *Vatairea macrocarpa* (Vmac) mas não àquela induzida pela lectina de *Dioclea violacea* (DvL). Painel A: n° de macrófagos do grupo controle (C) e dos animais tratados com tioglicolato (Tg; 3% v/v; 10 mL i.p.) Painel B: migração de neutrófilos (MN) induzida por salina (Sal, 1 mL), DvL (200 μg/cav.), Vmac (400 μg/cav.) e fMLP (10 × 10<sup>-9</sup> moles /cav.), nas cavidades não tratadas com Tg (-) ou tratadas (Tg). A MN foi avaliada 4 h após a injeção dos estímulos. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. de 6 animais. \*\* p < 0,05 comparado a C; \* p < 0,05 comparado a Sal e # p < 0,05 comparado ao grupo não tratado com Tg (-). ANOVA – Teste de Duncan.

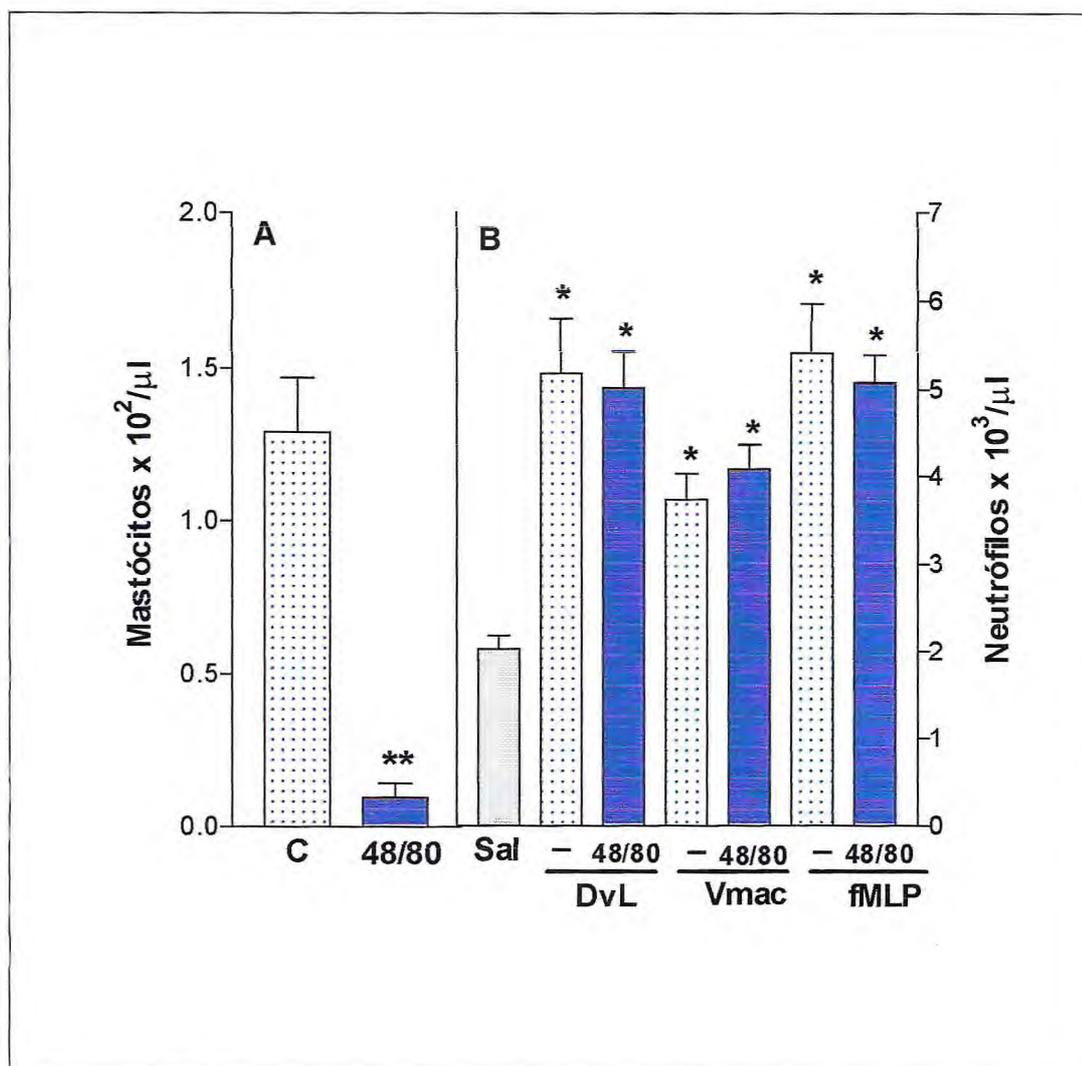
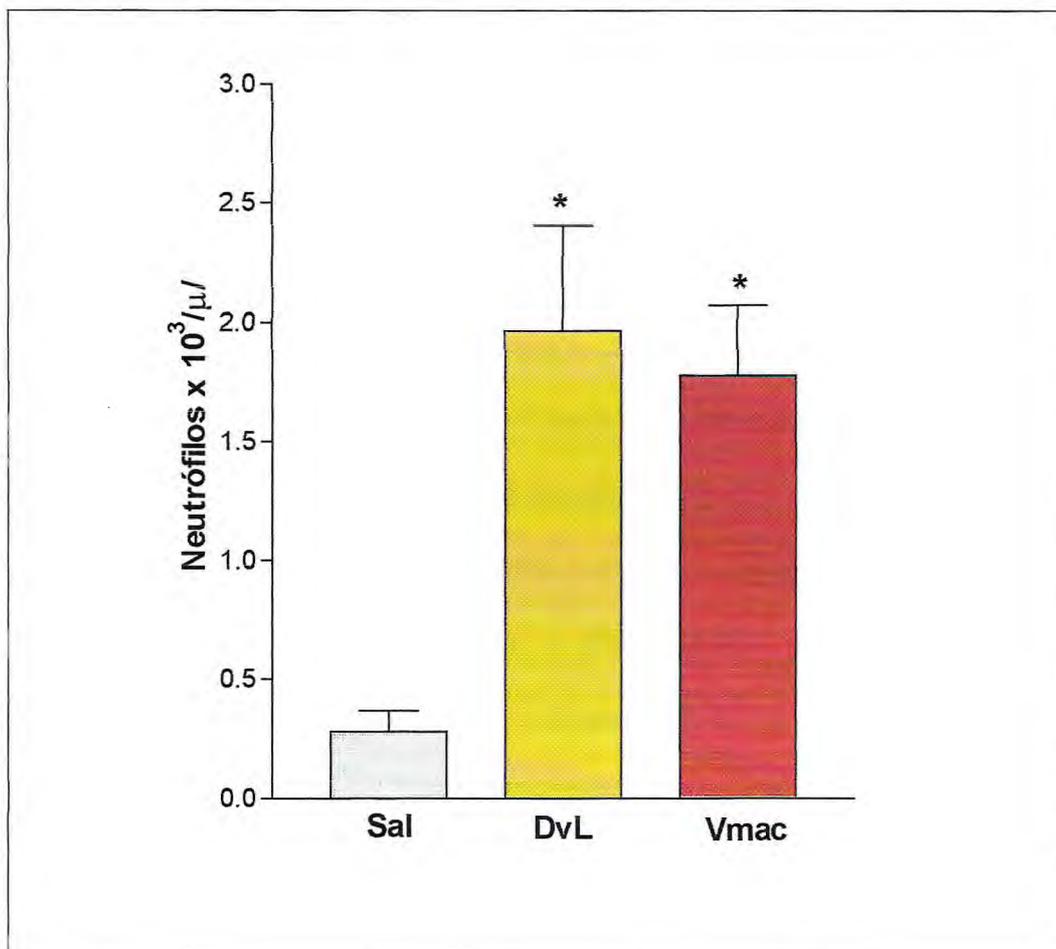


Figura 10. A depleção de mastócitos da cavidade peritoneal não altera a migração de neutrófilos (MN) induzida pelas lectinas de *Dioclea violacea* (DvL) e *Vatairea macrocarpa* (Vmac). Painei A: população de mastócitos em ratos controles (C) e pré-tratados com o composto 48/80. Painei B: MN induzida por salina (Sal, 1mL i.p.), DvL (200 μg/cav.), Vmac (400 μg/cav.) e fMLP (10 x 10<sup>-9</sup> moles/cav.) nas cavidades não tratadas com 48/80 (-) e nas tratadas (48/80). A MN foi avaliada 4 h após a injeção dos estímulos. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. de 6 animais. \*\* p < 0,05 comparado ao grupo C e \* p < 0,05 comparado ao Sal ANOVA – Teste de Duncan.



**Figura 11.** As lectinas de *Dioclea violacea* (DvL) e *Vatairea macrocarpa* (Vmac) induzem migração de neutrófilos no modelo de bolsa de ar subcutânea. DvL (200 μg/bolsa) e Vmac (400 μg/bolsa) foram administradas na bolsa de ar de 6 dias. A avaliação de neutrófilos foi realizada 6 h após a injeção das lectinas. Os animais controle (Sal) receberam somente salina estéril (1 mL/bolsa). \* p<0,05 comparado a Sal. ANOVA – Teste de Duncan.

### **5. Dexametasona e talidomida, mas não indometacina, MK-886, ou BN-50730, inibem a migração de neutrófilos induzida pela DvL ou Vmac no modelo de peritonite**

Com a estratégia de investigarmos os possíveis mediadores químicos envolvidos na atividade pró-inflamatória das lectinas estudadas realizamos o pré-tratamento dos animais com algumas drogas anti-inflamatórias.

Na **figura 12** esta demonstrado que a dexametasona (DEXA; 1mg/Kg; s.c.) e talidomida (TALI; 80 mg/Kg; s.c.) inibiram significativamente a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida pelas duas lectinas. A inibição pela dexametasona foi de 40% para DvL e 59% para a Vmac, enquanto que a talidomida inibiu em 43% e 58%, respectivamente, o efeito da DvL e Vmac, comparado aos animais que receberam somente as lectinas. Por outro lado, o tratamento dos animais com indometacina (INDO; 5mg/Kg; s.c.), inibidor da ciclooxigenase, com MK-886 (1 mg/Kg; v.o), um inibidor de leucotrieno e com o BN-50730 (10 mg/Kg; s.c.) que age antagonizando os efeitos do PAF, não produziram nenhum efeito inibitório sobre a migração de neutrófilos induzida pelas duas lectinas. Considerando que a inibição do efeito das lectinas ocorreu através da dexametasona, um glicocorticóide, e da talidomida, um inibidor seletivo de TNF- $\alpha$  postulamos então que o efeito quimiotático para neutrófilos das lectinas na cavidade peritoneal esteja ocorrendo através da liberação de citocinas por células residentes, incluindo TNF- $\alpha$ .

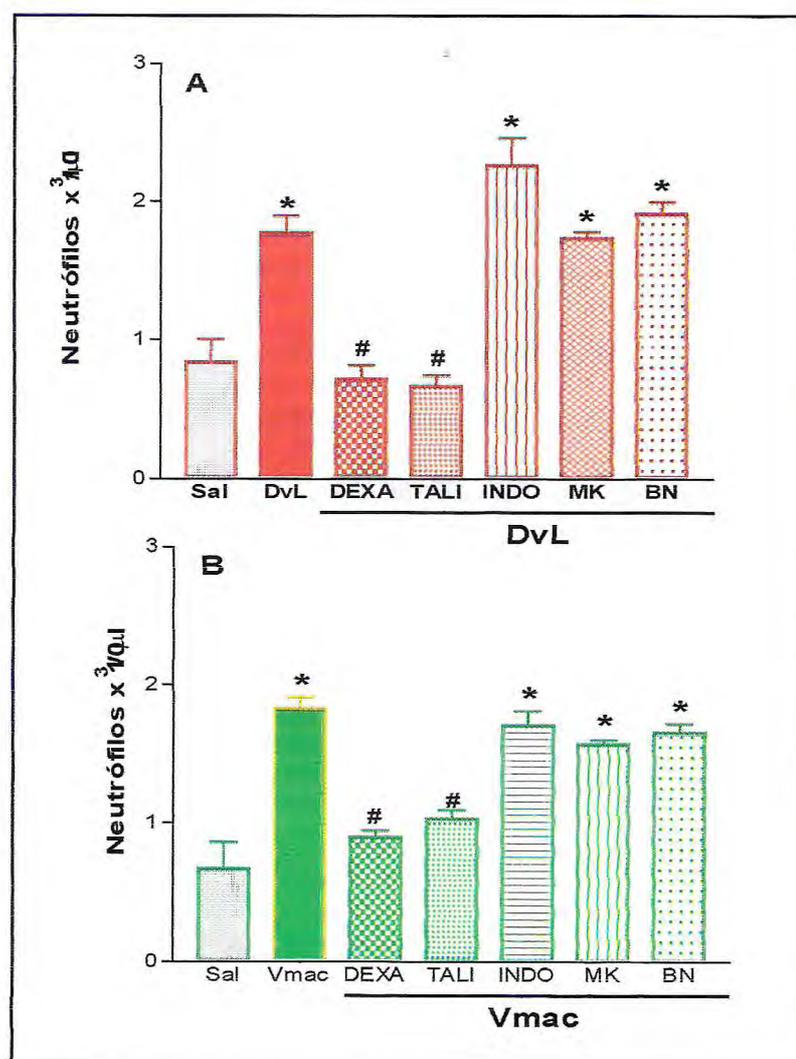


Figura 12 . Dexametasona e talidomida, mas não indometacina, MK-886 ou BN-50730, inibem a migração de neutrófilos induzida pelas lectinas de *V.macrocarpa* (Vmac) e *D. violacea* (DvL). Os animais foram pré-tratados com dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg; s.c.), talidomida (TALI; 80 mg/Kg; s.c.) e MK-886 (1 mg/Kg; v.o.), 1 h antes, ou com indometacina (INDO; 5 mg/Kg; s.c.) e BN-50730 (10 mg/Kg; s.c.), 30 min antes da administração i.p. de DvL (200  $\mu$ g/cav.) **Painel A** e Vmac (400  $\mu$ g/cav) **Painel B**. Os animais controle (Sal) foram injetados com 1 mL de salina estéril. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 6 animais em cada grupo. \*  $p < 0,05$  comparado ao Sal; #  $p < 0,05$  comparado ao grupo tratado somente com as lectinas. ANOVA – Teste de Duncan.

## 6. O sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados com Vmac induz migração de neutrófilos de forma dose- e tempo-dependente

Considerando que os resultados obtidos eram sugestivos de que a migração de neutrófilos induzida pela DvL e Vmac ocorresse através da liberação de mediadores químicos por células residentes, mais possivelmente macrófagos, testou-se a capacidade destas proteínas em estimular macrófagos, em cultura, a liberarem substâncias quimiotáticas.

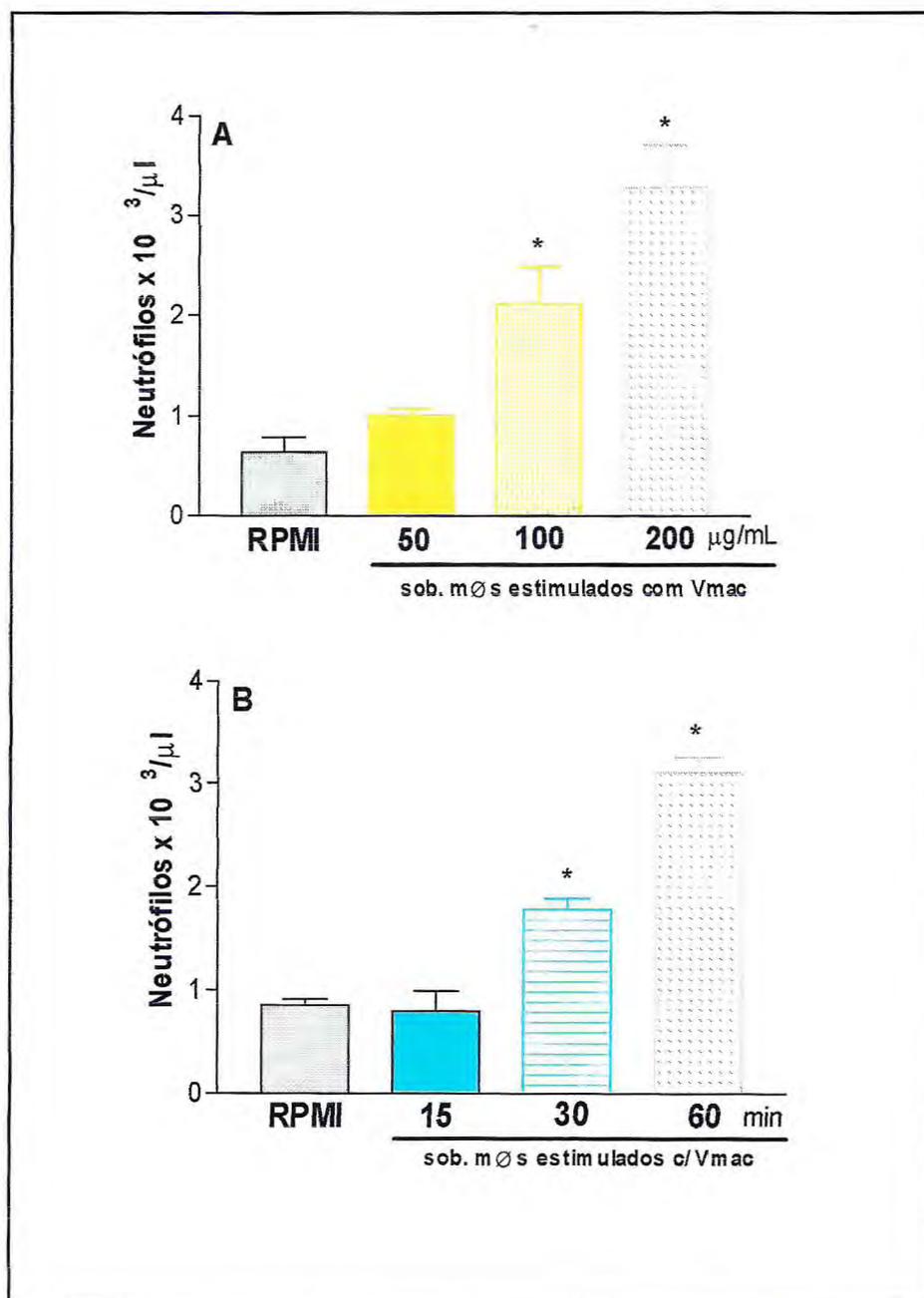
Como mostra a **figura 13** a Vmac foi capaz de estimular cultura de macrófagos de 12 horas a liberarem em seu sobrenadante uma substância quimiotática para neutrófilos. Vale salientar que, esta atividade ocorreu quando a lectina foi usada nas doses de 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  (**Fig. 13A**). Os sobrenadantes dos macrófagos estimulados com a Vmac nas doses citadas, quando injetados na cavidade peritoneal dos animais provocaram um aumento de 225% e 377%, respectivamente, no número de neutrófilos desta cavidade 4 horas após a administração. Ademais, foi demonstrado que a atividade quimiotática no sobrenadante era evidente quando a incubação do macrófago com a lectina ocorria no período de 30 e 60 minutos (**Fig. 13B**). Quando injetados em animais os sobrenadantes destas culturas promoveram aumento significativo de neutrófilos na cavidade peritoneal, 105% em 30 minutos e 240% em 60 minutos. Os percentuais foram obtidos em relação aos animais tratados i.p. com o sobrenadante de macrófagos não estimulados (RPMI).

Com estes resultados estabelecemos para os próximos experimentos a concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$  de Vmac com um período de incubação com o macrófago de 60 minutos. Condições nas quais observou-se maior efeito quimiotático.

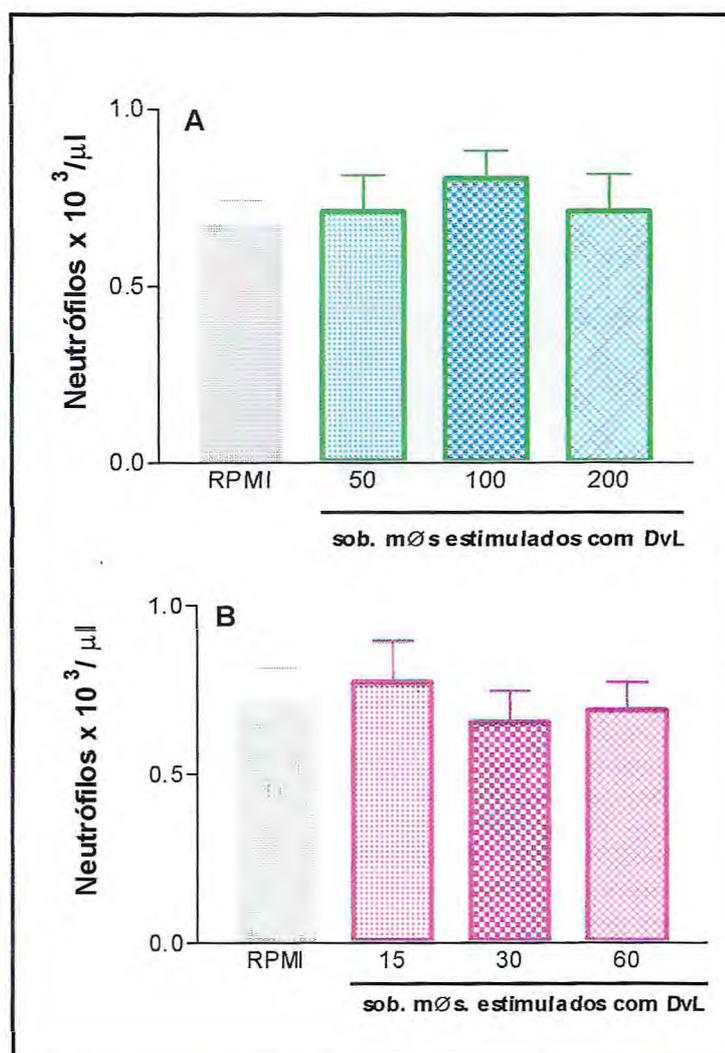
Diferente do que foi demonstrado para Vmac a DvL não foi eficiente em induzir o macrófago em cultura a liberar substância quimiotática (**Fig. 14**).

#### **7. O sobrenadante da cultura de mastócitos estimulados com DvL ou Vmac não apresenta atividade quimiotática para neutrófilos**

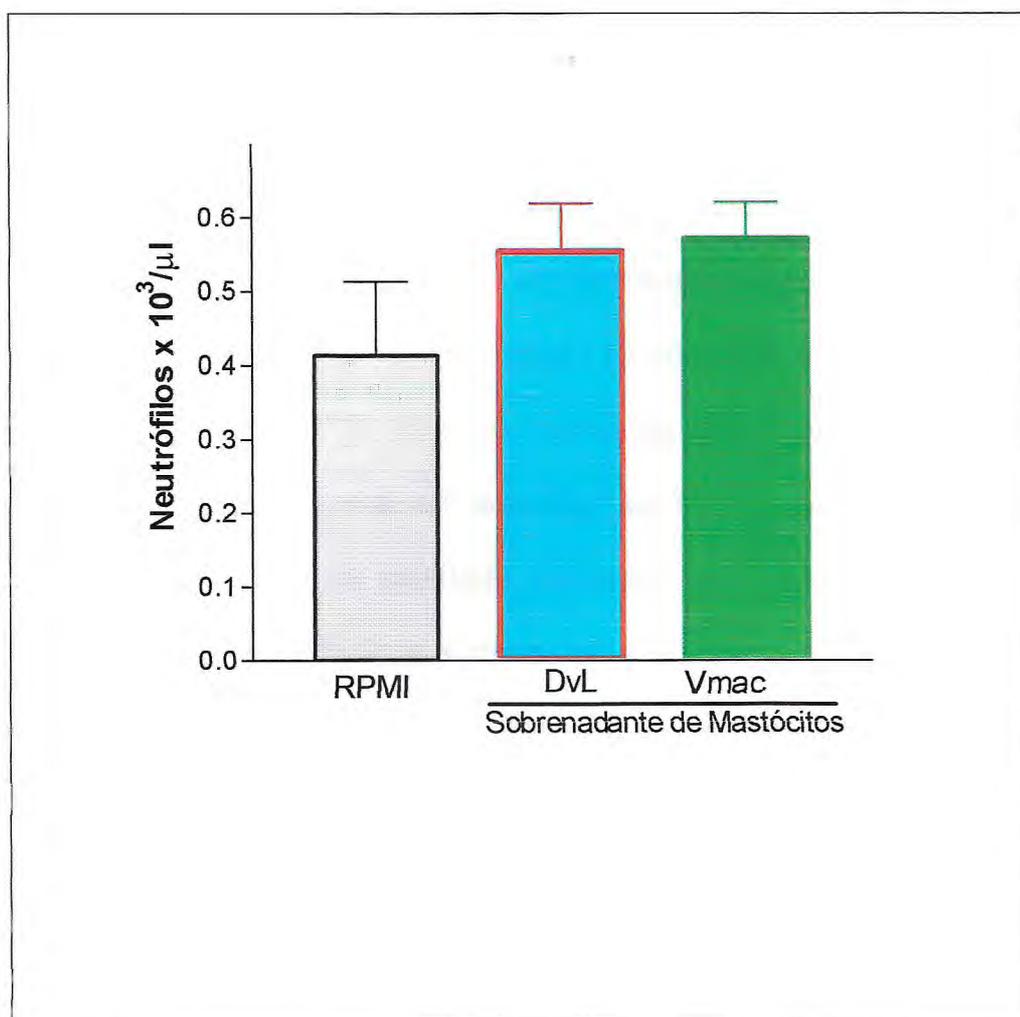
Podemos observar na **figura 15** que os sobrenadantes de mastócitos estimulados com DvL (200 µg/mL) ou Vmac (200 µg/mL) e injetados i.p. em animais normais não induziram migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Os efeitos foram comparados àqueles obtidos com a administração dos sobrenadantes da cultura não estimulada. Estes resultados corroboram com àquele obtido pela depleção de mastócitos com o composto 48/80. Desta forma, fica evidente que as duas lectinas não estimulam a liberação de substância quimiotática pelos mastócitos e que em relação a Vmac a célula responsável pela liberação desta substância é sem dúvida o macrófago. Por outro, os resultados obtidos até esta etapa do trabalho não são esclarecedores em relação as células envolvidas na migração de neutrófilos induzida pela DvL.



**Figura 13.** O sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados com a lectina de *Vatairea macrocarpa* (Vmac) induz migração de neutrófilos de forma dose- e tempo-dependente. Macrófagos em cultura de 12 h foram estimulados com Vmac (50, 100 e 200 µg/poço) durante 60 min (**Painel A**) ou com 200 µg/poço durante 15, 30 e 60 min (**Painel B**). O sobrenadante liberado pelos macrófagos foi administrado i.p. em animais normais. A avaliação da migração de neutrófilos foi realizada 4 h após. Os animais controles receberam apenas o sobrenadante de macrófagos não estimulados (RPMI). Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. de 5 animias. \*  $p < 0,05$  comparado a RPMI. ANOVA - Teste de Duncan.



**Figura 14. O sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados com DvL não induz migração de neutrófilos.** Macrófagos em cultura de 12 h foram estimulados com DvL (50, 100 e 200 µg/ml) durante 60 min (**Painel A**) ou com 200 µg/ml durante 15, 30 e 60 min (**Painel B**). O sobrenadante liberado foi administrado i.p. em animais normais. A avaliação de neutrófilos foi realizada 4 h após. Os animais controle receberam apenas o sobrenadante de macrófagos não estimulados com a DvL.



**Figura 15.** O sobrenadante de mastócitos em cultura estimulados com DvL ou Vmac não apresenta atividade quimiotática para neutrófilos. Mastócitos em cultura foram estimulados com DvL e Vmac (200  $\mu$ g/mL) durante 60 min. O sobrenadante obtido foi administrado (1mL; i.p.) em animais normais e a avaliação da migração de neutrófilos foi feita 4 h após. O controle geral recebeu 1 mL de RPMI i.p. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais.

## **8. O sobrenadante de cultura de células esplênicas totais estimuladas com DvL possui atividade quimiotática para neutrófilos**

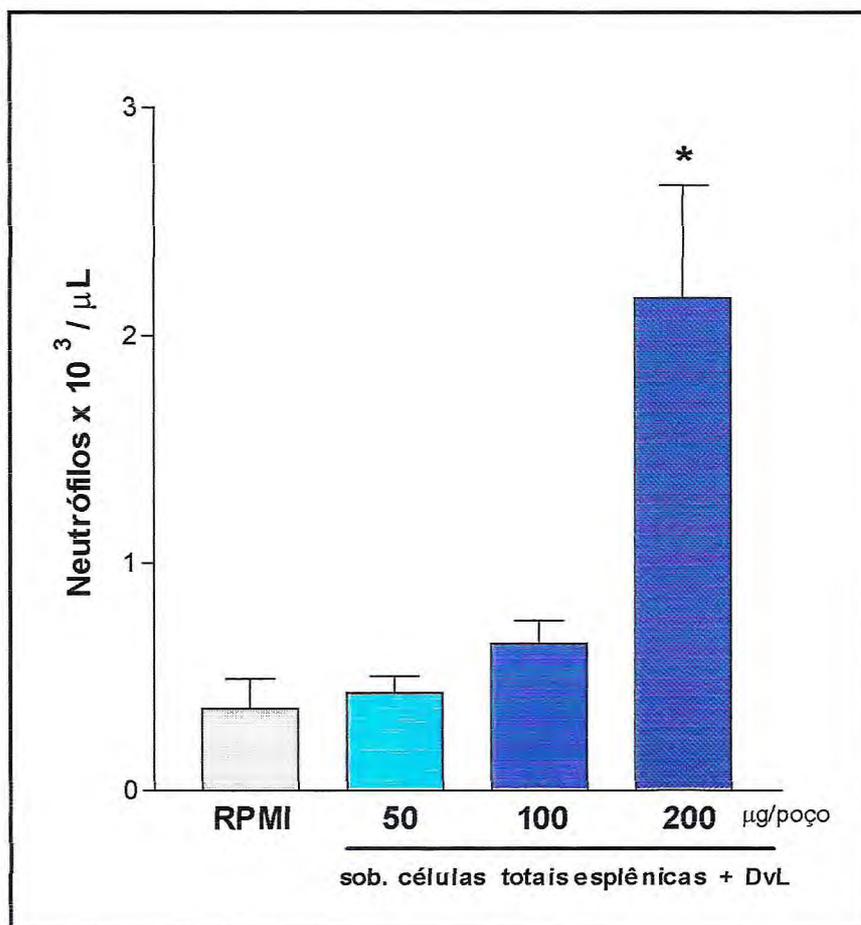
Com o intuito de esclarecer que tipo de célula após ser estimulada pela DvL seria capaz de liberar fator quimiotático para neutrófilos, resolveu-se investigar a atividade desta lectina em cultura de células de baço totais de ratos normais.

Para tanto, DvL (50, 100 e 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi adicionada à cultura de células de baço de 2 horas, durante 60 minutos, conforme demonstrado na **figura 16**. O sobrenadante colhido foi eficiente em aumentar em 530% a migração de neutrófilos, 4 horas após ser injetado na cavidade peritoneal de animais normais. Porém a atividade quimiotática foi detectada somente no sobrenadante da cultura estimulada com a maior dose utilizada da proteína (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A percentagem de aumento foi calculada em relação aos animais injetados com o sobrenadante de células não estimuladas (RPMI).

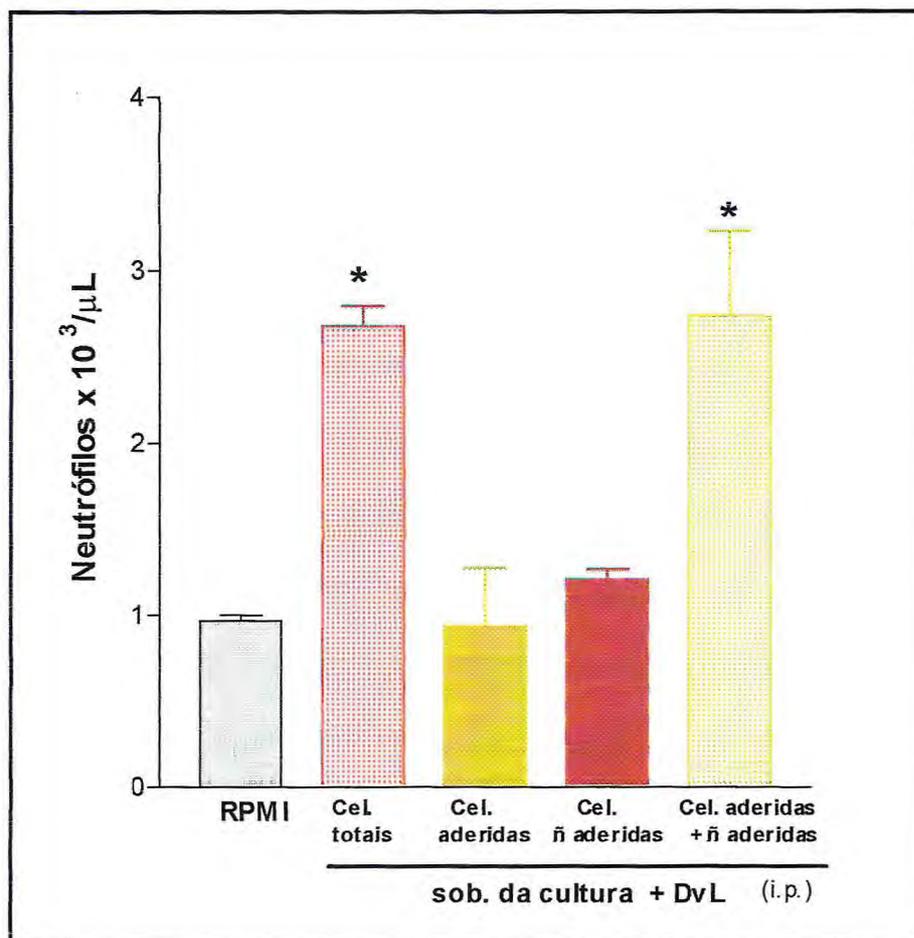
## **9. O efeito quimiotático do sobrenadante de células esplênicas totais estimuladas com DvL é depende da participação de células aderentes e não aderentes**

Para analisar quais as células da cultura de baço estimuladas com DvL estariam liberando fatores quimiotáticos para neutrófilos, as células aderentes foram separadas das não aderentes por sucessivas lavagens, e após este procedimento ambas foram estimuladas com DvL (200 $\mu\text{g}/\text{m}$ ) por 1 hora. A análise da **figura 17** mostra que os sobrenadantes das células aderidas e não aderidas, cultivadas e estimuladas com DvL separadamente, quando injetados na cavidade peritoneal não promoveram quimiotaxia para neutrófilo. Por outro lado, quando o sobrenadante de células não aderidas era acrescentado à cultura de células aderidas estimuladas

com a lectina, este novo sobrenadante, quando injetado na cavidade peritoneal de animais normais promoveu um aumento de 194% no número de neutrófilos, comparado ao grupo de animais tratados com sobrenadante de células totais não estimuladas (RPMI). Estes dados indicam que provavelmente a necessidade de diferentes células para que a DvL induza liberação de mediadores quimiotáticos para neutrófilos.



**Figura 16.** O sobrenadante de células esplênicas totais estimuladas com a lectina de *Dioclea violacea* (DvL), induz migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos, de forma dose-dependente. Células totais de baço em cultura foram estimuladas com DvL (50, 100 e 200 µg/poço) durante 60 min. O sobrenadante liberado pelas células foi administrado i.p. em animais normais. A avaliação da migração de neutrófilos foi realizada 4 h após. Os animais controles receberam apenas o sobrenadante de células não estimuladas (RPMI). Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. de 5 animias. \*  $p < 0,05$  comparado a RPMI. ANOVA - Teste de Ducan.



**Figura 17. O sobrenadante de células aderidas de baço estimuladas com DvL induz migração de neutrófilos com a participação de células não aderidas.** Células de baço (totais, aderidas e não aderidas) foram estimuladas com DvL (200μg/mL) durante 60 min. Numa parte da cultura de células aderidas estimuladas com DvL, foram adicionadas as células não aderidas e incubadas por 3 horas. Após as incubações os sobrenadantes das diferentes culturas foram injetados i.p. em animias normais. A avaliação da migração de neutrófilos foi realizada 4 horas após. Os animais controles receberam apenas o sobrenadante de células não estimuladas (RPMI). Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. de 5 animais. \* p<0,05 comparado a RPMI. ANOVA - Teste de Duncan.

**10. A atividade quimotática presente no sobrenadante de culturas de macrófagos e células esplênicas, estimuladas com Vmac e DvL, respectivamente foi inibida pela dexametasona *in vivo***

O pré-tratamento dos animais com moduladores farmacológicos foi feito antes da administração do sobrenadante das culturas estimuladas com DvL e Vmac. **A figura 18** mostra que somente a dexametasona (DEXA; 1mg/Kg; s.c.) foi capaz de inibir a migração de neutrófilos induzida pelo sobrenadante da cultura de macrófagos estimulada com Vmac (**Fig.18A**) e da cultura de células de baço totais estimuladas com DvL (**Fig. 18B**) em 73% e 39 %, respectivamente, quando comparados ao grupos nos quais os sobrenadante das culturas foram injetados em animais não pré-tratados com drogas ( - ). A indometacina (INDO; 5 mg/Kg; s.c.) ou MK-886 (1 mg/Kg; v.o) não inibiram o efeito quimiotático dos sobrenadantes. Estes resultados mostram que a dexametasona além de inibir a migração de neutrófilos induzida pela DvL e Vmac no modelo de peritonite (**Fig. 12**), inibe também àquela induzida pelo sobrenadante das culturas estimuladas por elas.

**11. A pré-incubação da cultura de macrófagos e células esplênicas totais com dexametasona inibe a liberação de fatores quimiotáticos induzida pela Vmac e DvL**

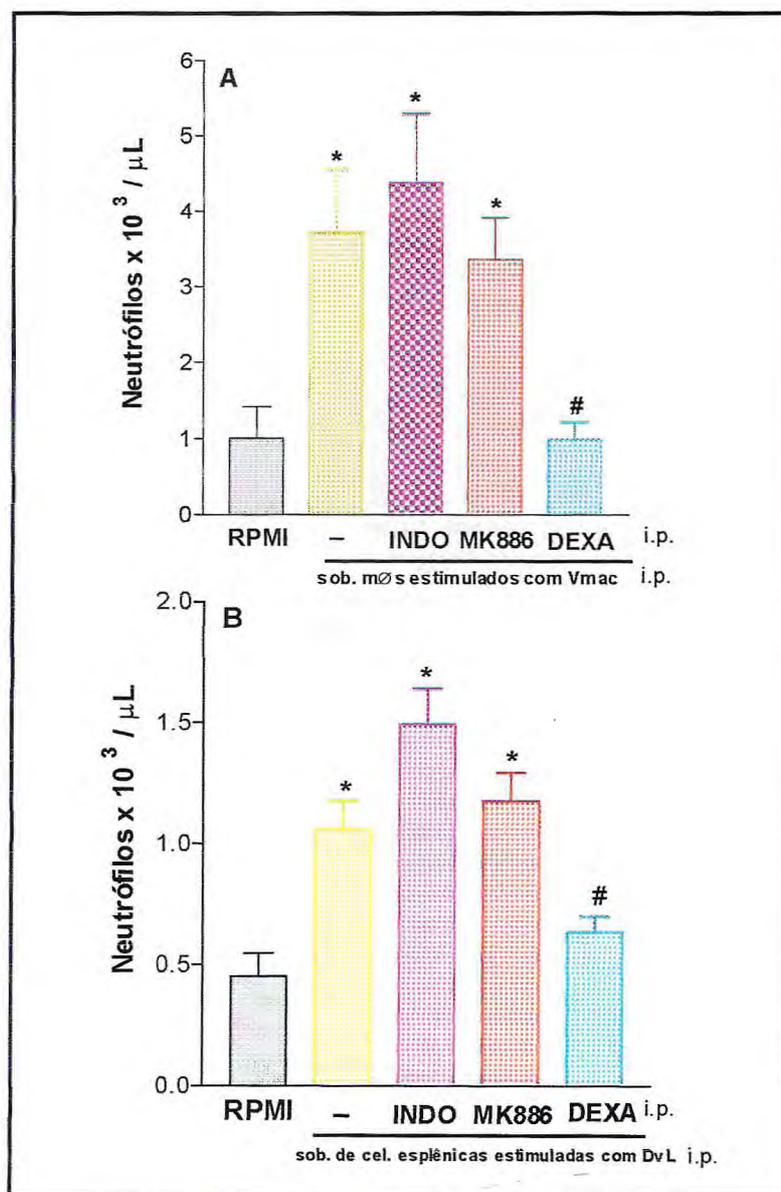
As culturas de macrófagos e células de baço totais estimuladas, respectivamente com Vmac e DvL, foram pré-incubadas com indometacina (INDO; 10 mM), MK-886 (1 Mm) ou dexametasona (DEXA; 10 µg/mL). O sobrenadante destas culturas foram injetados i.p. em animais normais.

Podemos observar na **figura 19** que somente o pré-tratamento da cultura com a dexametasona foi capaz de inibir a atividade quimiotática dos sobrenadantes

quando injetados i.p. nos animais. A inibição foi de 54% na cultura estimulada com Vmac (**Fig. 19A**) e em 45% naquela estimulada com DvL (**Fig. 19B**), comparada ao grupo de animais que receberam o sobrenadante estimulado, mas sem prévio tratamento com as drogas (-). Associando-se estes resultados àqueles encontrados na **figura 18** podemos sugerir que a dexametasona inibe não somente a liberação bem como o efeito das substâncias quimiotáticas presentes nos sobrenadantes de culturas estimuladas com Vmac e DvL.

## **12. Substâncias quimiotáticas presentes nos sobrenadantes de culturas estimuladas com Vmac e DvL possuem pesos moleculares superiores a 5000 daltons**

Os sobrenadantes das culturas de macrófagos e células de baço totais estimuladas, respectivamente com Vmac e DvL, foram filtrados em um sistema Amicon com membrana YM-5. Após este procedimento as frações retidas e não retidas foram administradas i.p. em animais normais e 4 horas após foi feita avaliação da migração de neutrófilos. Na **figura 20** observamos que somente as frações retidas na coluna foram capazes de induzir migração de neutrófilos na ordem de 173% na cultura estimulada pela Vmac (**fig. 20A**) e em 78% naquela estimulada com DvL (**fig. 20B**), as percentagens foram calculadas em relação ao grupo de animais tratados com sobrenadante de culturas não estimuladas (RPMI). Podemos afirmar que estas substâncias possuem pesos moleculares superiores a 5000 daltons, considerando que a membrana utilizada é permeável somente à substâncias com pesos moleculares inferiores.



**Figura 18** O pré-tratamento dos animais, com dexametasona mas não com MK-886 ou indometacina, inibe a migração de neutrófilos induzida pelo sobrenadante das culturas de mØs estimuladas com Vmac e células totais de baço estimuladas com DvL. Os animais foram pré-tratados ou não com dexametasona (DEXA; 1 mg/Kg; s.c.) e MK-886 (1 mg/Kg; v.o.) 1 h antes, ou com indometacina (INDO; 5 mg/Kg; s.c.), 30 min antes da administração i.p. dos sobrenadantes das culturas estimuladas com Vmac (**Painel A**) ou DvL (**Painel B**). A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após. Os animais controle foram tratados com 1 ml de RPMI. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais. \* $p < 0,05$  comparado ao RPMI e # $p < 0,05$  comparado ao grupo que recebeu somente o sobrenadante das culturas estimuladas. ANOVA - Teste de Duncan.

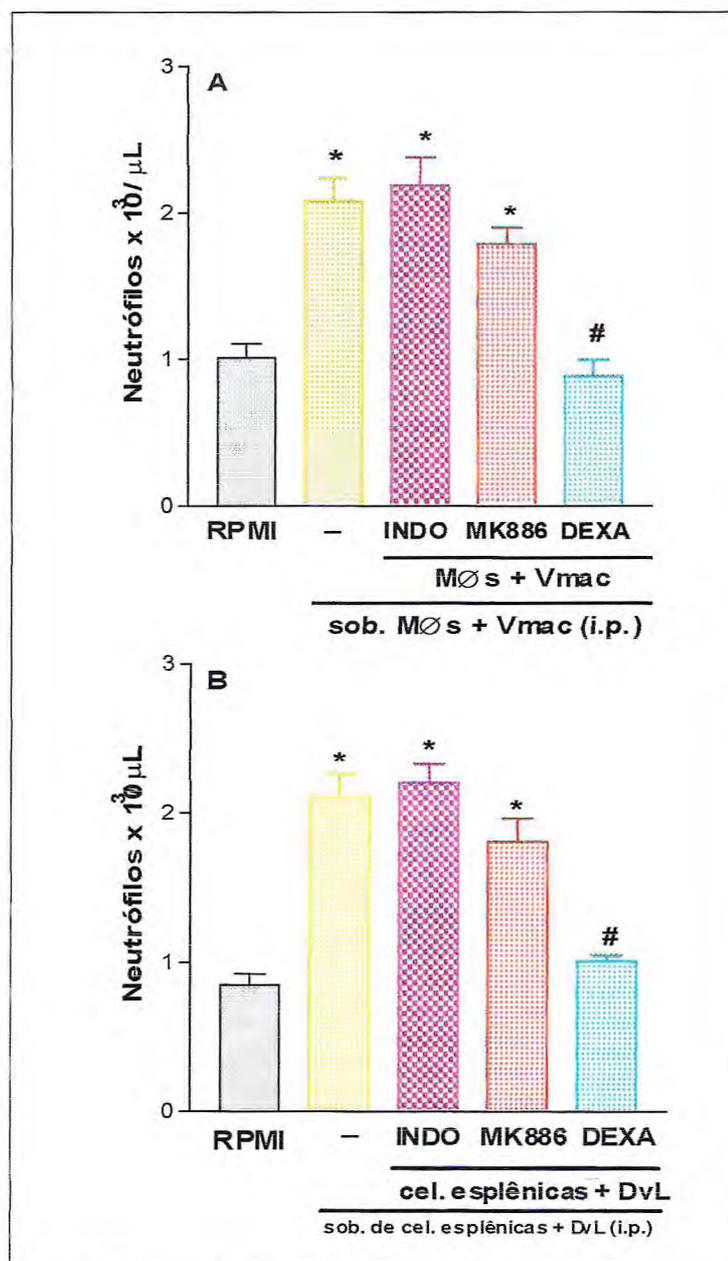
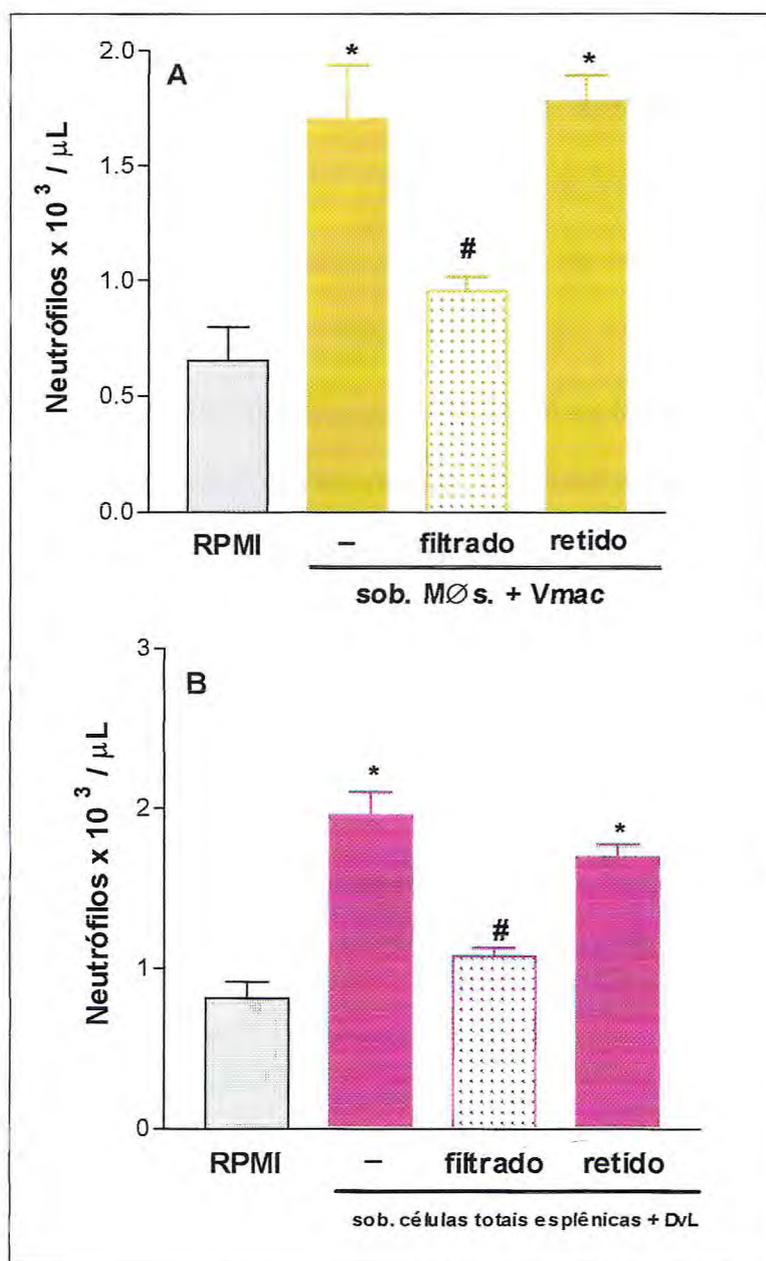


Figura 19. A pré-incubação das culturas de macrófagos e células totais de baço com dexametasona, inibe a liberação de fatores quimiotáticos para o sobrenadante das células estimuladas com Vmac e DvL. Macrófagos (Painel A) e células totais de baço (Painel B) foram incubadas com RPMI; dexametasona (DEXA; 10 mg/mL); indometacina (INDO; 10mM) e MK-886 (1 mM), 30 min antes da estimulação com Vmac (200mg/mL) e DvL (200 mg/mL). A pós 60 min., os estímulos foram retirados e as drogas novamente adicionadas as culturas e mantidas por 3h. O sobrenadante foi injetado i.p. em ratos normais e a MN avaliada 4 h após. Os animais controle foram injetados apenas com RPMI. Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. de 5 animais. \*  $p < 0,05$  comparado ao RPMI; #  $p < 0,05$  comparado ao grupo que recebeu o sobrenadante das culturas não tratadas com as drogas. ANOVA - Teste de Duncan.



**Figura 20.** As substâncias quimiotáticas presentes nos sobrenadantes das culturas de macrófagos estimulados com Vmac e células esplênicas com DvL possuem PMs superiores a 5000 daltons. Os sobrenadantes das culturas foram filtrados em um sistema Amicon, membrana YM-5. As frações filtradas e retidas foram injetadas (1 mL; i.p.) em animais normais e a migração de neutrófilos avaliada 4 horas após. O grupo controle positivo da migração recebeu sobrenadante sem passar por esse processo. O controle geral, recebeu somente RPMI. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais. \*  $p < 0,05$  comparado a RPMI; #  $p < 0,05$  comparado controle positivo. ANOVA – Teste de Duncan.

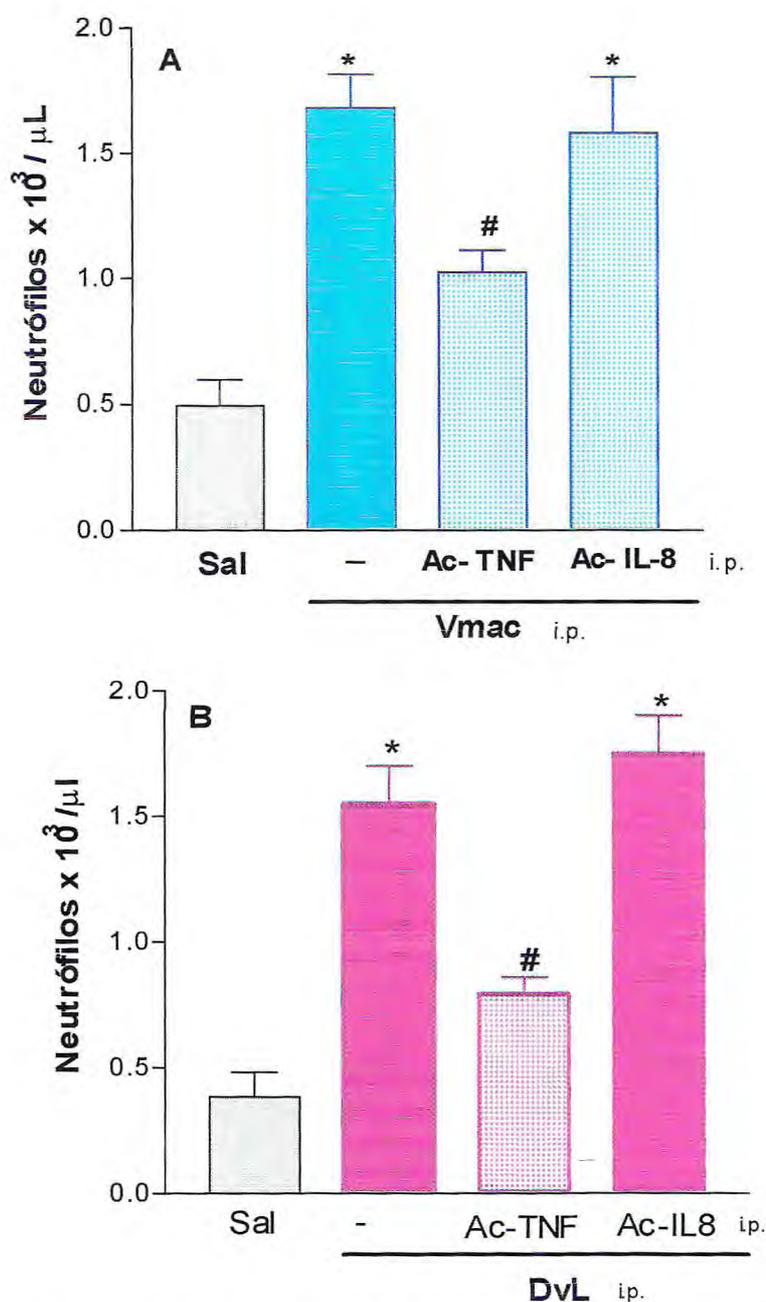
### 13. Anticorpo anti-TNF- $\alpha$ , mas não anti-IL-8, inibe *in vivo*, a migração de neutrófilos induzida pela Vmac ou DvL

O pré-tratamento i.p. dos animais com 50  $\mu$ L do soro anti-TNF- $\alpha$ , 5 minutos antes da administração i.p. da DvL (200  $\mu$ g/cavidade) e Vmac (400  $\mu$ g/cavidade), reduziu significativamente em 40% e 52%, a migração de neutrófilos induzida pela Vmac (**Fig 21A**) e DvL (**Fig. 21B**), respectivamente. As percentagens foram calculadas em relação aos grupos tratados somente com as lectinas. Por outro lado, o pré-tratamento com o soro anti-IL-8 não modificou o efeito quimiotático das duas lectinas. Este resultados associados àqueles demonstrados na **figura 12**, apontam o envolvimento de TNF- $\alpha$  na migração de neutrófilos induzida pela DvL e Vmac.

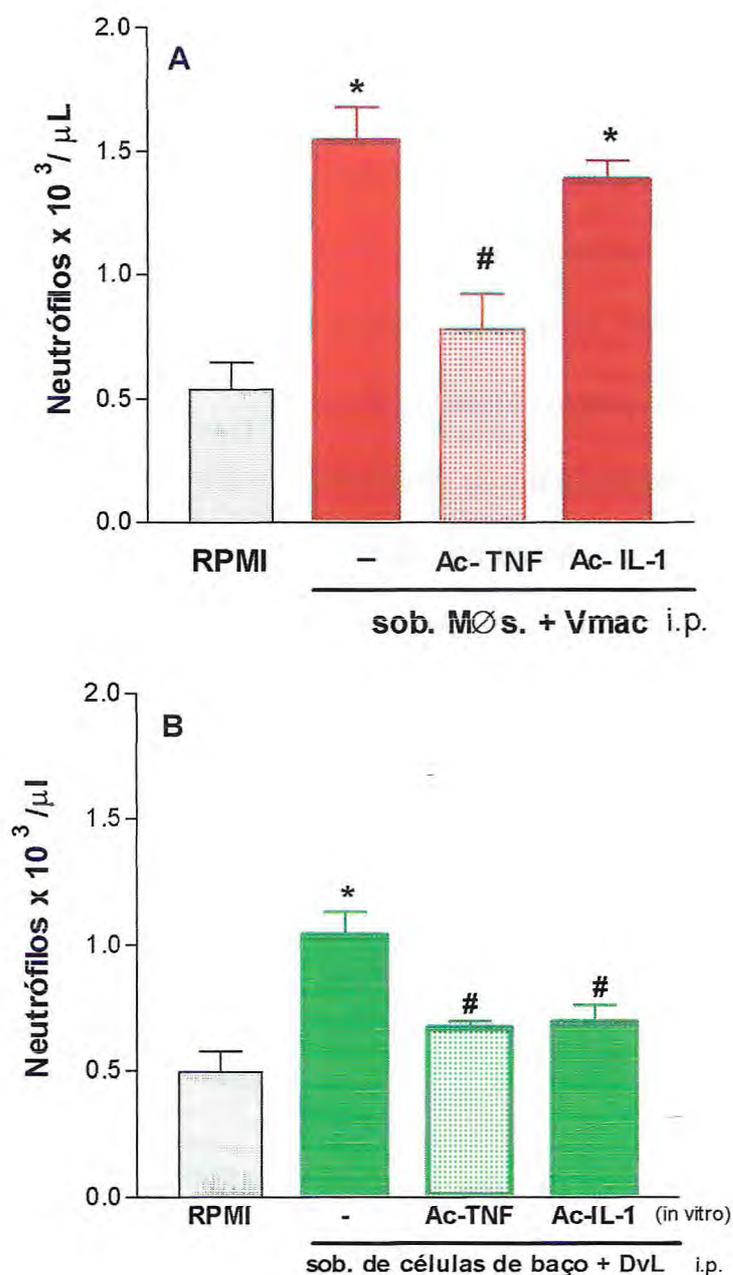
### 14. Atividade quimiotática dos sobrenadantes de células estimulados com Vmac e DvL é inibida, *in vitro*, pelo anticorpo anti-TNF- $\alpha$ . O anticorpo anti-IL-1 inibe a atividade do sobrenadante de células estimuladas com DvL, mas não com Vmac

Os sobrenadantes das culturas de macrófagos e células de baço totais estimuladas, respectivamente com Vmac e DvL, foram incubados com 50  $\mu$ l dos soros anti-TNF- $\alpha$  e anti-IL-1. Após 10 minutos os sobrenadantes foram coletados e administrados i.p. em animais normais. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 horas após. A **figura 22** mostra que o anti-TNF- $\alpha$  foi capaz de inibir em 50% e 37% migração de neutrófilos induzida, respectivamente pelos sobrenadantes das culturas estimuladas com Vmac (**Fig. 22A**) ou com DvL (**Fig. 22B**). Por outro lado o soro anti-IL-1 inibiu em 39% a atividade do sobrenadante de células estimuladas somente com DvL (**Fig. 22B**). As percentagens de inibição foram calculadas em

relação aos grupo injetados com o sobrenadante estimulado com as lectinas, sem tratamento com os anti-soros. Estes dados reforçam a idéia de que o TNF- $\alpha$  possa ser uma das substâncias envolvidas na quimiotaxia de neutrófilos induzida pela Vmac. Entretanto, os resultados obtidos neste trabalho são sugestivos de que na migração de neutrófilos induzida por DvL ocorre uma coordenação e cooperação entre diferentes células. Esta estariam liberando substâncias ativadoras e quimiotáticas entre as quais o TNF- $\alpha$  e a IL-1.



**Figura 21.** O pré-tratamento dos animais com soro anti-TNF- $\alpha$ , mas não com o soro anti-IL-8, inibe a migração de neutrófilos induzida pela Vmac e DvL. Os anticorpos anti-TNF- $\alpha$  e anti-IL-8 foram administrados (50  $\mu$ l; 0,2 mL; i.p.), 5 min antes da administração da Vmac (400  $\mu$ g/cav. Painel A) e DvL (200 mg/cav. Painel B). A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após a administração das lectinas e os resultados expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 5 animais. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo tratado com salina i.p. (Sal) e #  $p < 0,05$  comparado ao grupo no qual as lectinas foram injetadas. ANOVA - Teste de Duncan.



**Figura 22.** A pré-incubação com soro anti-TNF- $\alpha$  neutraliza a atividade quimiotática para neutrófilos do sobrenadante das culturas de macrófagos estimulados com a Vmac e de células de baço com DvL. anti-IL-1 neutraliza o sobrenadante da cultura estimulada com DvL. Macrófagos e células totais de baço em cultura foram estimulados com Vmac (200  $\mu$ g/poço) e (DvL 200  $\mu$ g/mL) respectivamente, durante 60 min. O sobrenadante liberado foi incubado com 50  $\mu$ l dos soros anti-TNF- $\alpha$  e anti-IL-1, durante 10 min e em seguida administrados i.p. em animias normais. O controle positivo recebeu sobrenadante não tratado e o controle negativo RPMI. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 5 animias. \*  $p < 0,05$  comparado a RPMI ; #  $p < 0,05$  comparado ao controle positivo. ANOVA - Teste de Duncan.

### 15. DvL e Vmac induzem efeito edematogênico de forma dose- e tempo-dependente.

A confirmação da atividade pró-inflamatória das lectinas em um outro modelo experimental de inflamação foi possível através da injeção subcutânea intraplantar de DvL e Vmac. As duas lectinas induziram edema de pata crescente e diretamente relacionado às doses administradas. Sendo a DvL eficiente nas doses de 100 e 200  $\mu\text{g/pata}$ , provocando respectivamente, um aumento de 129% e 270% do volume da pata comparado ao grupo controle (Sal). A Vmac mostrou-se edematogênica quando administrada nas doses de 200 e 400 $\mu\text{g/pata}$  com um aumento respectivo de 157% e 385% do volume das patas (**Fig 23B**).

Na investigação do curso temporal do edema induzido pela DvL e Vmac (**Fig. 23A**) foi observado um pico inicial 30 minutos após a administração das lectinas e um pico máximo na 4<sup>a</sup> hora para Vmac e 8<sup>a</sup> para DvL, seguidos de um decréscimo. Entretanto, 24 horas após, o efeito edematogênico das duas lectinas ainda era significativa.

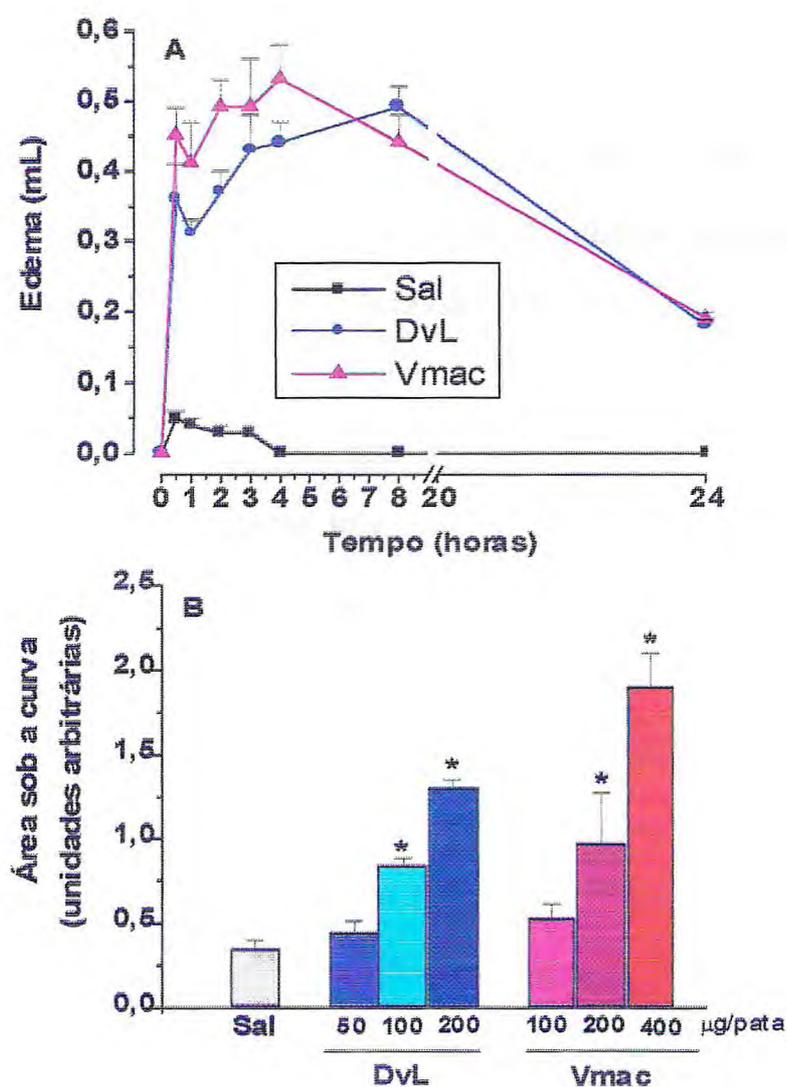


Figura 23. O edema de pata induzido pelas lectinas de *Dioclea violacea* (DvL) e *Vatairea macrocarpa* (Vmac) ocorre de forma dose- e tempo dependente. Painel A: DvL (200 µg/ pata) e Vmac (400µg/ pata) foram injetadas nas patas direitas dos animais, por via s.c. intraplantar. O edema foi medido 0,5 ,1, 2, 3, 4, 8, e 24, h após a injeção das lectinas, sendo expresso como a variação de volume (mL) entre os intervalos de tempo e o tempo zero (valor basal). Painel B: DvL (50, 100 e 200 µg/pata) e Vmac (100, 200 e 400 µg/ pata) foram administradas s.c. intraplantar, a área sob a curva da variação de volume de cada animal, foi calculada pelo método do trapézio. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M de 5 animais. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo de animais que receberam somente salina (Sal) . ANOVA – Teste de Duncan.

## **16. Atividade edematogênica da DvL e Vmac é reduzida em animais leucopênicos**

Com o intuito de investigar se o edema de pata induzido pela DvL e Vmac ocorre na dependência do número de leucócitos circulantes os animais foram pré-tratados com o metotrexate, uma droga imunossupressora que causa leucopênia com redução de polimorfonucleares.

Esta demonstrado na **tabela 1** que o pré-tratamento dos animais com metotrexate (2,5 mg/Kg; i.p.) durante três dias consecutivos, reduziu de forma significativa o número de leucócitos totais e de polimorfonucleares no sangue periférico em 70% e 93%, respectivamente, comparado ao controle de animais normais. Além disso, este tratamento em nada modificou a contagem de plaquetas e o hematócrito dos animais. Foi possível demonstrar uma significativa redução de 52% e 57%, respectivamente, no edema de pata induzido pela DvL e Vmac em animais submetidos ao tratamento, comparados ao edema em animais normais. É importante ainda destacar que as lectinas *per si*, quando injetadas na pata não provocam alterações nos padrões hematológicos analisados. Estes resultado sugerem o envolvimento de polimorfonucleares no efeito edematogênico das duas lectinas.

## **17. Edema induzido pela DvL e Vmac ocorre com infiltração celular**

A figura **24** mostra em microfotografias que a administração subcutânea intraplantar de DvL (200 µg/pata) e Vmac (400µg/pata) promove uma maior infiltração de células nas patas quando comparadas com o infiltrado observado nos animais tratados somente com salina.

**Tabela 1. Efeito da leucopenia induzida pelo metotrexate no edema de pata induzido pelas lectinas de *D.vilacea* (DvL) e *V. macrocarpa* (Vmac)**

	Animal normal			Animal pré-tratado com Metotrexate <sup>a</sup> (% de inibição)		
	Controle salina	DvL	Vmac	Controle leucopênico	DvL	Vmac
Leucócitos totais (Células/ $\mu$ l) <sup>b</sup>	6250 $\pm$ 1256	5789 $\pm$ 897	6363 $\pm$ 695	1478 $\pm$ 367 <sup>e</sup> (70%)	1345 $\pm$ 68 <sup>f</sup> (77%)	1539 $\pm$ 101 <sup>f</sup> (75%)
Neutrófilos (células/ $\mu$ l) <sup>b</sup>	1125 $\pm$ 205	980 $\pm$ 234	1023 $\pm$ 198	82 $\pm$ 17 <sup>e</sup> (93%)	63 $\pm$ 8 <sup>f</sup> (94%)	79 $\pm$ 10 <sup>f</sup> (92%)
Plaquetas (células / $\mu$ l) <sup>b</sup>	370482 $\pm$ 13054	350578 $\pm$ 9768	360782 $\pm$ 10489	370945 $\pm$ 7568	380123 $\pm$ 9456	379290 $\pm$ 8234
Hematocrito (%) <sup>c</sup>	38,5 $\pm$ 2,1	36,7 $\pm$ 2,5	37,1 $\pm$ 1,9	40,4 $\pm$ 2,3	41,9 $\pm$ 1,9	42,3 $\pm$ 1,8
Edema <sup>d</sup> (área sob a curva)	0,38 $\pm$ 0,02	1,48 $\pm$ 0,05 <sup>e</sup>	1,98 $\pm$ 0,2 <sup>e</sup>	0,32 $\pm$ 0,05	0,71 $\pm$ 0,2 <sup>f</sup> (52%)	0,85 $\pm$ 0,3 <sup>f</sup> (57%)

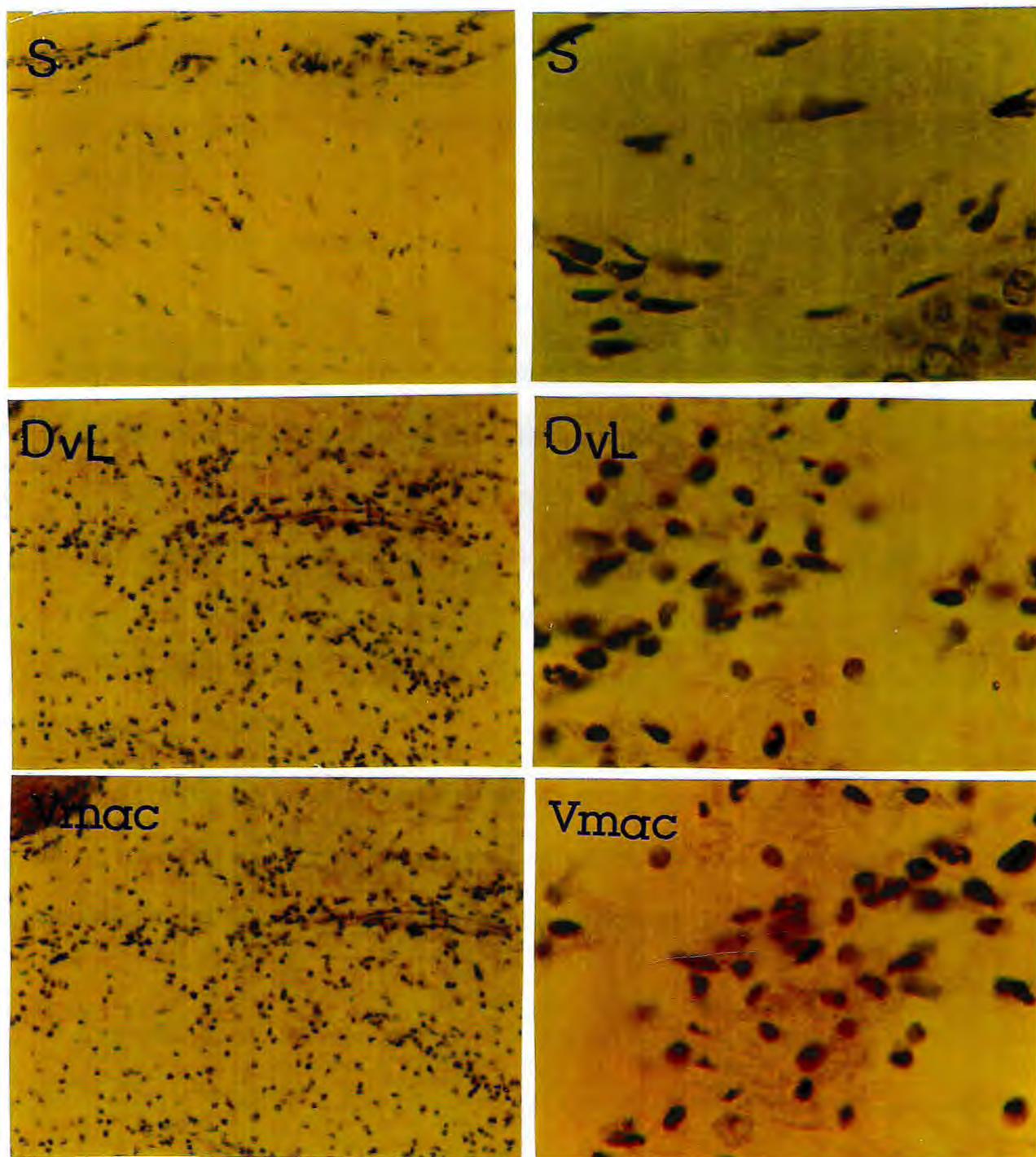
<sup>a</sup> Os animais foram tratados diariamente com metotrexate (2,5 mg/Kg; i.p.) durante 3 dias.

<sup>b</sup> A contagem total e diferencial de leucócitos e a de plaquetas foram feitas em câmara de Neubauer. Os valores foram expressos como a média do n° de células  $\pm$  DP de 5 animais.

<sup>c</sup> Os valores do hematocrito foram expressos como a média da percentagem  $\pm$  D.P.

<sup>d</sup> Medida do edema da pata foi feita 4 h após a injeção subplatar de salina (controle), DvL (200  $\mu$ g/pata) e Vmac (400  $\mu$ g/pata), os valores foram expressos como a média das áreas sob a curva  $\pm$  D.P.

<sup>e,f</sup> Diferenças estatísticas significativas com  $p < 0,05$  quando comparados respectivamente ao controle (salina) e aos animais normais tratados com as lectinas.



**Figura 24.** Microfotografias representando a infiltração celular no edema de pata induzido pela injeção s.c. intraplantar de DvL ou Vmac. Observa-se claramente um aumento de células nas patas dos animais tratados com DvL(200  $\mu$ g/pata) ou Vmac (400 $\mu$ g/pata), comparados com os animais que receberam salina na pata (S). Coloração HE; aumento de 100 x à esquerda e 400 x à direita.

## **18. Os açúcares específicos da DvL e Vmac inibem suas atividades pró-inflamatórias**

A abordagem feita neste experimento foi no sentido de demonstrar o envolvimento dos domínios lectínicos na resposta inflamatória induzida pelas duas lectinas utilizadas. Assim, DvL (200 µg/cavidade) e Vmac (400 µg/cavidade) foram administradas associadas com 0,1 M de seus respectivos açúcares específicos,  $\alpha$ -metil-D-manosídeo com a DvL e  $\alpha$ -D-galactose com Vmac. Na **figura 25** podemos constatar que a administração das lectinas associadas com seus açúcares específico provocou significativa inibição da migração de neutrófilos na cavidade peritoneal, sendo esta na ordem de 35% para a DvL e 34% para a Vmac, quando comparado aos grupo nos quais as lectinas foram injetadas sozinhas. Vale salientar que os açúcares aqui utilizados não induziram migração *per si*. (resultados não mostrados)

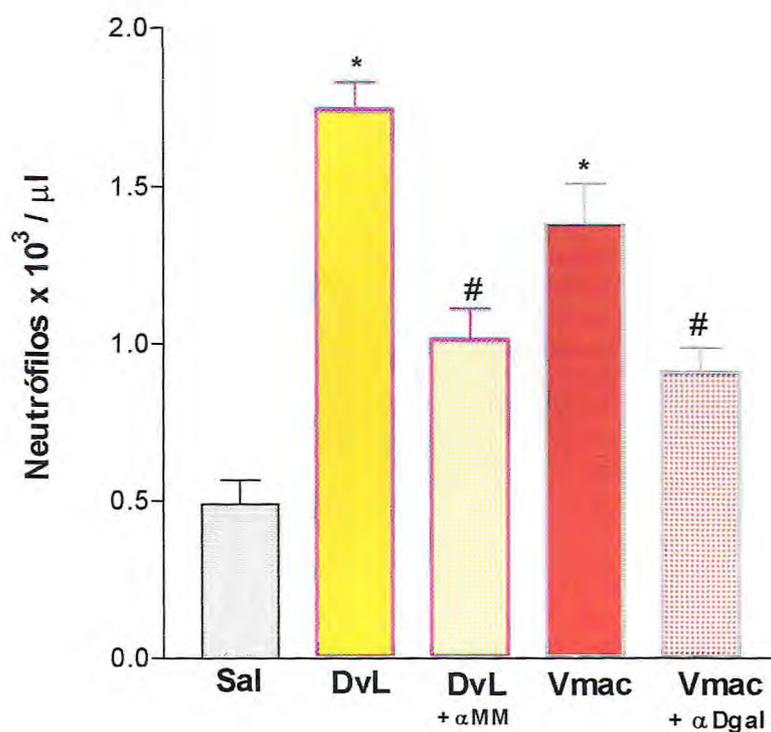
Corroborando com os achados na literatura, mais uma vez fica evidente que as lectinas para exercerem suas atividades biológicas precisam interagir com outros sistemas através de seus sítios de ligação à carboidratos.

## **19.A desnaturação térmica abole o efeito pró-inflamatório da DvL e Vmac**

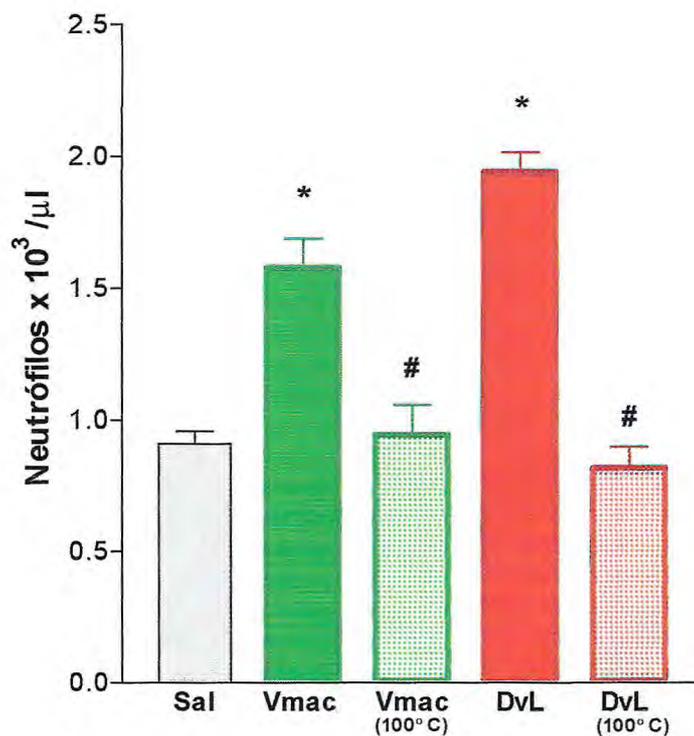
Com a finalidade de investigar se a estrutura tridimensional das lectinas estudadas é importante na realização de suas atividades pró-inflamatórias, estas proteínas foram submetidas a um tratamento térmico a 100 °C por um período de 10 minutos. Na **figura 26** esta bem demonstrado que tanto a Vmac quanto a DvL quando desnaturadas não induzem migração de neutrófilos, ou seja, o tratamento térmico reverteu de forma significativa o efeito observado para as duas lectinas.

## **20. A desmetalização da DvL bloqueia seu efeito pró-inflamatório**

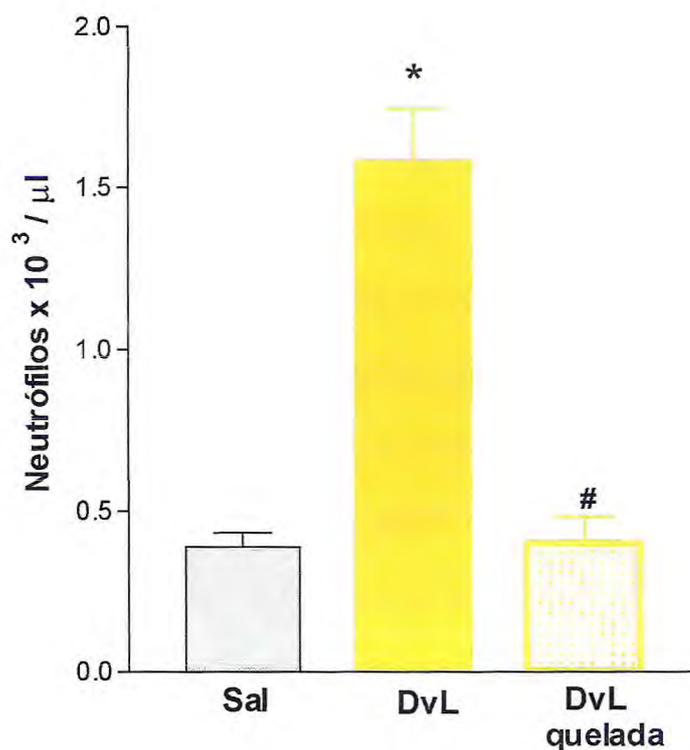
Considerando que a DvL é uma lectina possuidora de sítios de ligações à metais que são importantes para manutenção de sua estrutura tridimensional, investigou-se o efeito do bloqueio destes sítios na atividade pró-inflamatória induzida por esta lectina. Para tanto, a DvL foi desmetalizada com EDTA e posteriormente injetada na cavidade peritoneal dos animais. Os dados mostrados na **figura 27** revelam que o bloqueio destes sítios abole totalmente a migração de neutrófilos induzida pela DvL, quando comparada ao grupo tratado com DvL intacta.



**Figura 25.**  $\alpha$ -metil-D-manosídeo ( $\alpha$ -MM) e  $\alpha$ -D-galactose ( $\alpha$ Dgal) inibem respectivamente, o efeito pró-inflamatório da DvL e Vmac. DvL (200  $\mu$ g/cav.) e Vmac (400mg/cav.) foram administradas i.p., sozinhas ou em associação com 0,1 M de seus respectivos açúcares específicos:  $\alpha$ MM /DvL e  $\alpha$ Dgal/Vmac. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após e os resultados expressos como a média  $\pm$  E.P.M de 5 animais. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo tratado com salina (Sal) e #  $p < 0,05$  comparado aos grupos com as lectinas sozinhas. ANOVA -Teste de Duncan.



**Figura 26.** A desnaturação térmica abole o efeito pró-inflamatório das lectinas de *D.violacea* e *V.macrocarpa*. As lectinas, inativadas ou não pelo tratamento a 100 °C por 10 min, foram injetadas por via i.p. (Vmac; 400 μg/cav.) e (DvL; 200 μg/cav.). A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após a administração das proteínas. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. de 5 animais. \* p < 0,05 comparado ao grupo tratado com salina (Sal) e # p < 0.05 comparado ao grupo tratado com a lectina íntegra. ANOVA - Teste de Duncan.



**Figura 27.** A desmetalização da lectina de *D.violacea* com EDTA, bloqueia seu efeito pró-inflamatório. DvL (200 µg/cav.) desmetalizada ou não em diálise contra EDTA (5mM) por 18 h a 4 °C, foi administrada por via intraperitoneal. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após e os resultados expressos como a média ± E.P.M. de 5 animais. \* p < 0,05 comparado ao grupo tratado com salina (Sal) e # p < 0,05 comparado ao grupo tratado com a lectina íntegra. ANOVA -Teste de Duncan.

#### IV. DISCUSSÃO

Muitas são as evidências que apontam o envolvimento de proteínas ligadoras de carboidratos mediando o reconhecimento em uma grande variedade de sistemas biológicos. Nos últimos anos, tem sido ressaltada a importância dos carboidratos nos mecanismos envolvidos na interação entre células em uma grande variedade de fenômenos biológicos. Sendo assim, a capacidade que as lectinas possuem de interagir especificamente com carboidratos, transformaram estas proteínas em valiosas ferramentas para variadas linhas de pesquisas biológicas e o campo para o estudo e uso destas moléculas tem crescido intensamente.

Na resposta inflamatória aguda ocorre o recrutamento de neutrófilos do sangue para o tecido injuriado, onde estão envolvidos processos complexos e multimediados, nos quais estão incluídas interações seqüenciais entre os neutrófilos e células endoteliais e componentes da matriz extracelular. O controle destes mecanismos envolve a ativação de receptores presentes nas células endoteliais e sangüíneas bem como a expressão de glicoproteínas adesivas na membrana celular. (McEVER, 1992 ).

A adesão ao endotélio é um pré-requisito para a infiltração dos neutrófilos no local da inflamação. Este processo é mediado por glicoproteínas denominadas selectinas, que através de domínios lectínicos reconhecem e interagem de forma específica com carboidratos de superfície.

A participação deste tipo de interação tem sido confirmada na comunidade científica, por uma série de estudos, como por exemplo a demonstração de que a E-selectina apresenta efeito quimiotático para neutrófilos *in vitro*, embora este não tenha sido ainda demonstrado *in vivo* (LO *et al.*, 1991) e a atividade quimiotática para neutrófilos de um fator liberado de macrófagos estimulados com LPS foi inibida por

D-galactose *in vitro* e *in vivo* (CUNHA & FERREIRA, 1986; DIAS-BARUFFI *et al.*, 1993). Nesse sentido, o nosso grupo de pesquisa demonstrou uma atividade anti-inflamatória para algumas lectinas vegetais, ligadoras de glicose-manose ou N-acetilglicosamina, em três diferentes modelos de inflamação experimental: 1. Inibição da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos, no modelo de peritonite; 2. Atividade anti-edematogênica em ratos, no modelo de edema de pata (ASSREUY *et al.*, 1997; ALENCAR *et al.*, 1999) 3. Inibição dos eventos inflamatórios celulares e vasculares e da lesão urotelial induzida por ciclofosfamida em camundongos, no modelo de cistite hemorrágica (ASSREUY *et al.*, 1999). Nesses, o efeito inibitório foi melhor observado em eventos inflamatórios associados à infiltração de neutrófilos nos sítios inflamados. Mais recentemente demonstramos a atividade pró-inflamatória da PSP-I/PSP-II, uma espermedesina suína (ASSREUY *et al.*, 2001). É importante ressaltar que em todos esses modelos experimentais, o tratamento dos animais com as lectinas, associadas a seus carboidratos específicos, reverteram os efeitos desencadeados pelas mesmas. Estes dados apontam claramente o envolvimento de carboidratos nas atividades biológicas demonstradas por estas proteínas.

Neste trabalho, a DvL e a Vmac foram capazes de induzir a migração de neutrófilos e mononucleares para a cavidade peritoneal de ratos, de forma dose- e tempo- dependente. O padrão celular na cavidade após a injeção das lectinas, foi característico de um processo inflamatório agudo, com um influxo de neutrófilos nas primeiras horas e valores máximos na 4<sup>a</sup> hora, retornando aos valores basais entre 24 e 48 horas para a DvL e 8 e 24 horas para a Vmac. Entretanto, a DvL mostrou-se mais potente, sendo eficiente nas doses de 200 e 400µg/cavidade, enquanto a Vmac induziu migração de neutrófilos somente na dose 400µg/cavidade, e com menor

intensidade. O curso temporal da migração de mononucleares ocorreu inversamente àquela verificada para os neutrófilos, ou seja, a proporção que o número de neutrófilos declinava havia aumento de mononucleares, sendo que os valores máximos destas células foram encontrados 72 horas após as lectinas serem administradas.

Com o intuito de investigarmos a participação de células residentes, principalmente macrófagos e mastócitos, na resposta inflamatória induzida pelas duas lectinas no modelo de peritonite, foram feitas modificações no padrão destas células na cavidade peritoneal, através de metodologias já descritas anteriormente na literatura.

Verificou-se que a depleção de células peritoneais residentes pela lavagem da cavidade, levou a uma redução significativa da migração de neutrófilos induzida pela DvL e Vmac. Estes resultados apontaram para a hipótese de que a migração de neutrófilos induzida pelas duas lectinas fosse dependente da atividade de células residentes. Corroborando com esta idéia, demonstramos ainda que as duas lectinas não induziam quimiotaxia para neutrófilos no modelo *in vitro*, no qual os neutrófilos foram separados das demais células. Ademais, não existe relatos na literatura de lectinas vegetais que induzam migração de neutrófilos por mecanismo direto. Entretanto, alguns estudos têm demonstrado a capacidade de lectinas de plantas em induzir migração de neutrófilos *via* células residentes, como exemplo citam-se a ConA, lectina de *Canavalia ensiformes* e a Canatoxina, uma proteína ligadora de açúcar, também presente nesta semente (RODRIGUEZ *et al.*, 1992; BARJA-FIDALGO *et al.*, 1992).

Quando a população de macrófagos da cavidade peritoneal foi potenciada pelo tratamento dos animais com tioglicolato, observamos um aumento significativo

da resposta inflamatória induzida somente pela Vmac. Porém, a migração de neutrófilos induzida pela DvL não foi afetada pelo aumento destas células. Sendo assim, ficou clara a participação do macrófago na migração de neutrófilos induzida pela Vmac. Por outro lado, não podemos descartar a idéia de que os macrófagos sejam necessários na migração de neutrófilos induzida por DvL, considerando que no modelo de bolsa de ar subcutânea, onde se tem uma cavidade criada artificialmente com uma população celular formada por fibroblastos e macrófagos "likes", as duas lectinas quando nela injetadas, promoveram migração de neutrófilos de forma mais intensa do que àquela demonstrada no modelo de peritonite.

Esta bem demonstrado na literatura a participação de células residentes (macrófagos, mastócitos e linfócitos) controlando a migração de neutrófilos na resposta inflamatória através da liberação de fatores quimiotáticos como os leucotrienos (RANKI *et al.*, 1990), componentes do sistema complemento (WHALEY & FERGUNSON, 1981) e citocinas, principalmente a IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$  (STARUCH & WOOD, 1985) e o fator quimiotático para neutrófilos liberado por macrófago (MNCF) ([ CUNHA & FERREIRA, 1986]).

Anteriormente, várias pesquisas foram conduzidas com intuito de investigar o mecanismo pelo qual algumas substâncias exógenas como a carragenina, zymosan e LPS ou mediadores quimiotáticos como a IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  induzem migração de neutrófilos. Os resultados demonstrados são evidentes de que estas substâncias induzem o recrutamento de neutrófilos por um mecanismo indireto, no qual os macrófagos residentes, parecem ser a célula responsável pelo controle deste processo (SOUZA & FERREIRA, 1985; FACCIOLI *et al.*, 1990; RIBEIRO *et al.*, 1990). Entretanto, foi demonstrado por Ribeiro e colaboradores (1997) que o fMLP e

o C5a induzem migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos, por um mecanismo independente de células residentes.

De acordo com Souza e colaboradores (1988) a migração de neutrófilos induzida pela administração de carragenina ou zymosan na cavidade peritoneal diminui quando a cavidade é depletada de células residentes e aumenta com o pré-tratamento com tioglicolato. A participação dos macrófagos no recrutamento de neutrófilos foi também demonstrada por Cunha & Ferreira (1986). Estes autores, observaram que o LPS quando administrado na cavidade peritoneal de ratos, induzia migração de neutrófilos através da liberação por macrófagos de um fator quimiotático para neutrófilos (MNCF).

Os mastócitos têm um importante papel nas respostas alérgicas e nos processos inflamatórios. Estas células liberam mediadores que apresentam atividade quimiotática para neutrófilos, incluindo o LTB<sub>4</sub> (FREELAND *et al.*, 1988) e algumas citocinas como a IL-8 e TNF- $\alpha$  (RIBEIRO *et al.*, 1991; GORDON *et al.*, 1990).

Com a finalidade de investigar o papel dos mastócitos na resposta inflamatória da Vmac e DvL, o número destas células foi reduzido em 95% pelo tratamento dos animais com o composto 48/80. Quando as duas lectinas, DvL e Vmac, foram injetadas intraperitonealmente, a redução de mastócitos não afetou a migração de neutrófilos induzida por nenhuma das lectinas estudadas. A partir destes resultados, ficou evidente que os mastócitos não estavam envolvidos no recrutamento de neutrófilos induzido pela DvL ou Vmac.

A modulação farmacológica da resposta inflamatória induzida pela DvL ou Vmac foi realizada pré-tratando os animais com alguns bloqueadores farmacológicos. No rastreamento da participação de derivados lipídicos, foram utilizados a indometacina, inibidor específico da enzima cicloxigenase, o MK886,

inibidor específico de lipoxigenase ou um antagonista do receptor de PAF, BN50730. Além destes, os animais receberam também um glicocorticóide, a dexametasona ou um inibidor seletivo de TNF- $\alpha$ , a talidomida. Nesse protocolo experimental, observou-se que somente a dexametasona e a talidomida foram capazes de inibir a migração de neutrófilos induzida pelas duas lectinas. Estes resultados deram suporte para se descartar o envolvimento de mediadores químicos originados do metabolismo do ácido araquidônico: prostaglandinas e leucotrienos, além de excluïrem também a participação do PAF. Ademais, são sugestivos da participação de citocinas, inclusive TNF- $\alpha$ . Esta hipótese é fortalecida por achados na literatura nos quais atribuem aos glicocorticóides o bloqueio da transcrição do RNA mensageiro de determinadas citocinas, do tipo TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-8, com conseqüente inibição da síntese destes fatores protéicos por macrófagos (BEUTLER *et al.*, 1986; BARNES & ADCOCK, 1993; AUPHAN *et al.*, 1995; WILCKENES & DeRIJK, 1997). É importante ressaltar que, além de inibir a produção de citocinas, os glicocorticóides também reduzem a expressão de seus receptores (BARNES & ADCOCK, 1993). A idéia de que TNF- $\alpha$  esteja envolvido no efeito pró-inflamatório da DvL e Vmac é corroborada com os dados encontrados na literatura de que a talidomida suprime de forma seletiva a produção desta citocina através da degradação do RNA mensageiro (MOREIRA *et al.*, 1993).

Com a finalidade de comprovar a hipótese de que a migração de neutrófilos induzida pela Vmac e DvL fosse mediada por células residentes, particularmente macrófagos, através da síntese e liberação de mediadores inflamatórios por estas células, inicialmente foi avaliada a capacidade destas duas lectinas em estimular culturas de macrófagos a liberarem mediador(es) pró-inflamatório(s).

Os resultados dessa nova investigação demonstraram que macrófagos peritoneais de ratos, *in vitro*, estimulados com doses crescentes de Vmac, liberaram no sobrenadante da cultura de forma dose- e tempo-dependente, uma substância que quando injetada na cavidade peritoneal dos animais induzia migração de neutrófilos. Por outro, a DvL não foi eficiente em estimular a liberação de substância quimiotática.

Estes resultados confirmam a hipótese inicial de que o efeito ativador da migração de neutrófilos induzido por Vmac é dependente da interação desta lectina com macrófagos, provavelmente através da ligação com receptores de membrana. Vmac induz a liberação de fator (es) quimiotático (s) para neutrófilo. Esta idéia é suportada pelos relatos da literatura que conferem ao macrófago um papel de célula de alarme na resposta inflamatória *via* liberação de citocinas como IL-1, IL-8 e TNF- $\alpha$ . Ratificando a importância do macrófago no controle da migração de neutrófilos durante o processo inflamatório, Ribeiro e colaboradores.(1995) demonstraram que culturas de macrófagos estimulados com IL-1 $\beta$  ou LPS, liberam um RNA de baixo peso molecular o qual amplifica a resposta inflamatória através da liberação de citocinas.

Apesar dos resultados obtidos até esta etapa do trabalho não serem esclarecedores em relação ao tipo de célula residente envolvida na resposta inflamatória induzida pela DvL, sua ação indireta era evidente, fundamentado nos seguintes fatos: 1) A depleção de células residentes da cavidade peritoneal diminuiu de forma significativa a migração de neutrófilos induzida por DvL; 2) A DvL não induziu quimiotaxia de neutrófilos *in vitro* e 3) induziu migração de neutrófilos no modelo de bolsa de ar subcutânea. Esta última afirmação torna mais evidente a

participação do macrófago entretanto, a elucidação de quais células estariam modulando esta atividade, implicava em maiores investigações.

Várias pesquisas têm sido conduzidas com o intuito de comprovar a importância da cooperação celular na indução da liberação de citocinas por algumas lectinas vegetais. Gatner e colaboradores (1996) demonstraram que linfócitos de nódulos linfóides, tímicos ou esplênicos quando coestimulados na presença de células de Kupffer e estimulados com ConA, anti-CD3 ou enterotoxina B de *Estafilococcus*, levam a um aumento da produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2 e IL-6. Outras lectinas, como a jacalina, presente nas sementes de jaca, induzem a secreção de interleucinas em populações mistas de células do sangue periférico humano *in vitro* (PBMC) (BLASCO *et al.*, 1995). Esta proteína induz também proliferação seletiva de linfócitos T CD4+ a qual é abolida quando as células aderentes são removidas da cultura. Ainda neste contexto, foi demonstrado que baixas concentrações de macrófagos levam a menor estimulação de linfócitos T pela ConA e menor resposta proliferativa (PEACOCK *et al.*, 1990). Por outro lado, há lectinas como o mitógeno PWM, que sobre linfócitos humanos, induzem a produção de citocinas (IL-2, GM-CSF e TNF- $\alpha$ ) por um mecanismo direto, sem necessitar de células acessórias (WALLAYS & CEUPPENS, 1993).

Com base nestas informações, foi aventada a hipótese de que a DvL para induzir resposta inflamatória poderia necessitar de outras células além do macrófago. Assim foi testada a capacidade da DvL em estimular uma cultura mista de células a liberar fatores quimiotáticos. Para tanto utilizamos a cultura de células esplênicas. Os dados desta nova estratégia experimental mostraram que a DvL quando incubada por 1 hora com células esplênicas totais induzia de forma dose-dependente a liberação no sobrenadante de uma substância capaz de promover a

migração de neutrófilos quando injetada intraperitonealmente. Por outro lado, quando as células esplênicas foram separadas daquelas que aderiam ou não na placa de cultura, observou-se que, os sobrenadantes desta duas novas culturas estimuladas com DvL não apresentavam atividade quimiotática de neutrófilos quando injetados na cavidade peritoneal. No entanto, surpreendentemente, a atividade quimiotática era verificada no sobrenadante da cultura de células esplênicas aderidas estimuladas com DvL, quando acrescentava-se a estas células a cultura de células não aderidas. Com base nestes resultados e em face dos conhecimentos anteriormente relacionados, especulamos que o mecanismo pelo qual a DvL induz migração de neutrófilos possivelmente, seja um processo multimediado que segue as seguintes etapas: 1.a DvL interage inicialmente com receptores localizados na membrana de macrófagos. 2. o macrófago estimulado com a lectina libera substâncias ativadoras de linfócitos e finalmente 3. os linfócitos ativados liberam fatores quimiotáticos para neutrófilos.

Esta idéia é fundamentada com a demonstração anterior de que a DvL induz a produção de TNF- $\alpha$  e IL-10 em culturas de PBMC de humanos e produção de NO em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos (CAVADA *et al.*, 2001). Além disso, a liberação por macrófagos de fatores ativadores de linfócitos (LAF) foi demonstrada ainda nos anos 1970, através da detecção destes fatores no sobrenadante de células aderentes de sangue periférico humano (GERSON & KONDON, 1971). Posteriormente este fator foi renomeado como IL-1 e hoje, sabe-se que várias substâncias são capazes de induzir a produção desta citocina em monócitos e macrófagos, entre estas citam-se: fatores exógenos como endotoxinas, exotoxinas, hemaglutininas de vírus e protozoários (DURUM & OPPENHEIM, 1989)

e substâncias endógenas como C5a , TNF- $\alpha$  (DINARELLO *et al.*, 1986) e a própria IL-1 (WARNER *et al.*, 1987).

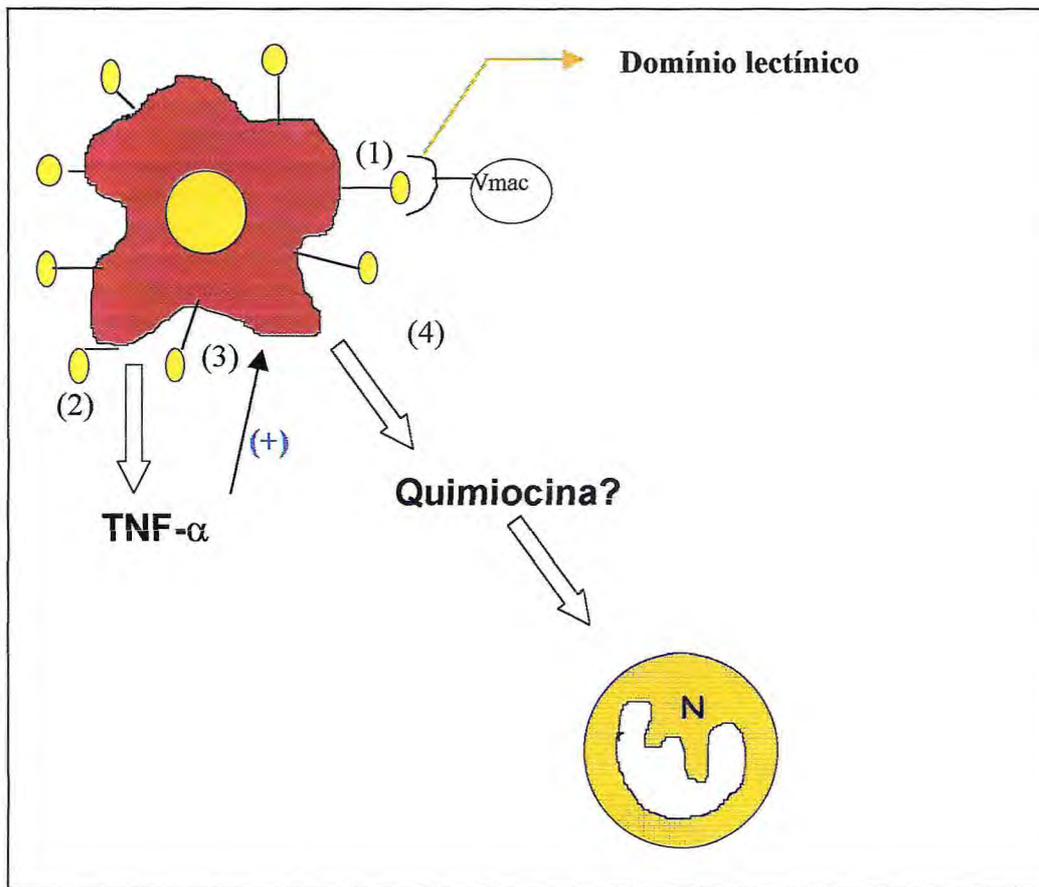
Ratificando ainda a idéia anterior é importante ressaltar que, o papel dos linfócitos na migração de neutrófilos tem sido fortemente sugerido e está claro na literatura que estas células medeiam a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos através da liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1, IL-8 e TNF- $\alpha$  (ROBINSON *et al.*, 1993). Foi demonstrado ainda, que linfócitos incubados com ConA e PHA liberam, no sobrenadante um fator que quando injetado intraperitonealmente induz migração de neutrófilos (KLEIN *et al.*, 1995). Na mesma linha de evidência, comprovou-se que a depleção de células T com anticorpos leva a redução da migração de neutrófilos induzida pela injeção intraperitoneal do *Mycobacterium* em ratos imunizados (APPELBERG, 1992).

Com base nos resultados obtidos até então, novos protocolos experimentais foram planejados no sentido de caracterizar parcialmente a(s) substância(s) quimiotáticas para neutrófilos presente (s) nos sobrenadante das culturas de células estimuladas com DvL ou Vmac. Inicialmente foi realizado um estudo de modulação farmacológica dividido em duas etapas: a primeira etapa consistiu do tratamento dos animais com dexametasona, indometacina e MK 886, antes da administração intraperitoneal dos sobrenadantes das culturas de células estimuladas com DvL ou Vmac. Na Segunda etapa, as culturas de células antes de serem estimuladas com as lectinas, foram incubadas com as mesmas drogas, sendo o sobrenadante final injetado nos animais. Observou-se no primeiro protocolo que a dexametasona, mas não a indometacina ou MK 886, foi capaz de inibir a migração de neutrófilos induzida pelos sobrenadantes das culturas estimuladas por DvL ou Vmac. O mesmo resultado foi observado no segundo protocolo, ou seja, somente a dexametasona foi

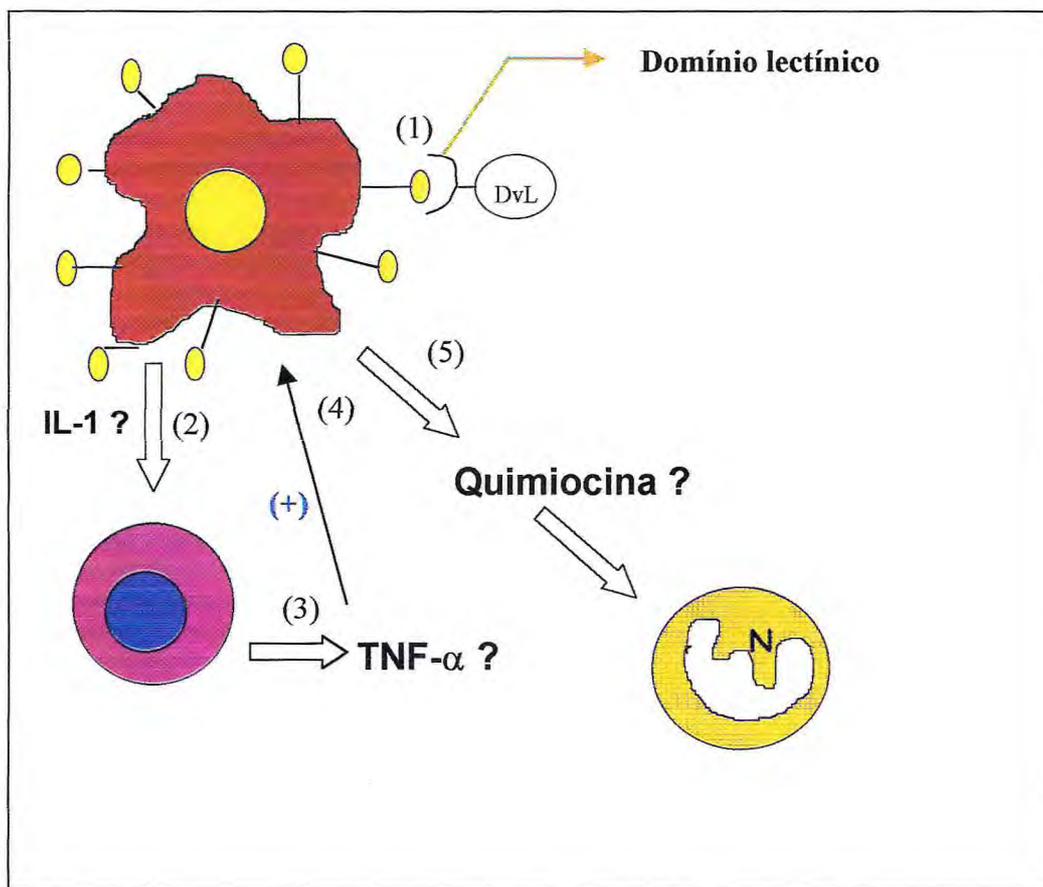
eficiente em inibir a liberação do (s) fator(es) quimiotático(s) pelas culturas de células estimuladas por DvL ou Vmac. Este conjunto de dados sugere que a dexametasona além de inibir a liberação desta(s) substância(s) pelas células estimuladas com estas lectinas, inibe também sua atividade quimiotática para neutrófilos *in vivo*. Dando prosseguimento ao estudo da caracterização parcial desta(s) substância(s), os sobrenadantes da cultura de células estimuladas com DvL ou Vmac foram filtrados em um sistema AMICON. Este procedimento mostrou que estas substâncias apresentam pesos moleculares superiores a 5000 Daltons. Considerando que as citocinas apresentam pesos moleculares superiores a 6000 Daltons e que a dexametasona inibe a síntese destas substâncias, os resultados observados nesta abordagem são fortemente sugestivos de que as substâncias quimiotáticas liberadas por culturas de macrófagos ou células esplênicas totais estimulados, respectivamente com Vmac e DvL, podem tratar-se de citocinas pró-inflamatórias.

Com o intuito de investigar quais os tipos de mediadores que estariam sendo liberados pelas células ativadas pela DvL ou Vmac, os sobrenadantes das culturas destas células foram pré-incubados com os soros durante 10 minutos e em seguida foram administrados na cavidade peritoneal dos animais. Observou-se que anticorpo anti-TNF- $\alpha$ , mas não o anticorpo anti-IL1- $\beta$  neutralizou a atividade da(s) substância(s) liberada(s) pelos macrófagos estimulados com Vmac. Por outro lado, a neutralização da(s) substância(s) liberada(s) pela cultura de células esplênicas estimuladas por DvL, foi observada com os dois anticorpos (anti-IL-1- $\beta$  e anti-TNF- $\alpha$ ). Neste mesmo sentido, os animais foram pré-tratados com os anticorpos anti-TNF- $\alpha$  e anti-IL-8, 5 minutos antes da administração da DvL ou Vmac. Verificou-se que o anticorpo anti-TNF- $\alpha$ , mas não o anti-IL-8 foi capaz de reduzir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida pelas duas lectinas.

Os dados obtidos nesta investigação deram suporte para a formulação das seguintes hipóteses: 1) O TNF- $\alpha$  está sendo liberado por macrófagos estimulados com a Vmac *in vitro*, e por ser um agente quimiotático indireto (FACCIOLI *et al.*, 1990) causa migração de neutrófilos *in vivo* via liberação de quimiocina(s) por macrófagos; 2) Considerando a IL-1 como um fator ativador de linfócitos, esta citocina está sendo liberada por macrófagos estimuladas com a DvL e após ser liberada, induz a liberação de TNF- $\alpha$  linfócitos, e da mesma forma como foi sugerido para a Vmac, esta citocina induz a migração de neutrófilos *in vivo*, não interagindo diretamente com neutrófilos, mas através da liberação de quimiocina(s) por macrófagos residentes na cavidade peritoneal. **(Figuras 28 e 29)**



**Figura 28. Hipótese de mecanismo para o efeito pró-inflamatório da Vmac.** A migração de neutrófilos induzida pela Vmac ocorre através dos seguintes eventos: **(1)** interação dos domínios lectínicos de Vmac com receptores glicídicos localizados na membrana dos macrófagos, levando à ativação do macrófago e a **(2)** liberação de uma substância pró-inflamatória **(3, 4)** Após ser liberado (TNF- $\alpha$  ?) induz quimiotaxia de neutrófilos *via* liberação de quimiocinas por macrófagos.



**Figura 29. Hipótese de mecanismo para o efeito pró-inflamatório da DvL.** A migração de neutrófilos induzida pela DvL ocorre através dos seguintes passos: **(1)** interação dos domínios lectínicos de DvL com receptores glicídicos localizados na membrana dos macrófagos, levando à ativação do macrófago e a **(2)** liberação de uma substância ativadora de linfócitos (IL-1 ?) **(3, 4)** Após ser liberada (il-1 ?) induz o linfócito a liberar uma substância pró-inflamatória (TNF- $\alpha$  ?) **(5)** ao ser liberada induz quimiotaxia de neutrófilos *via* liberação de quimiocinas por macrófagos.

A atividade pró-inflamatória da DvL e Vmac foi confirmada também no modelo experimental de edema de pata. As duas lectinas apresentaram atividade edematogênica de forma dose- e tempo-dependentes. Foi demonstrado anteriormente na literatura que o edema de pata induzido por carragenina é dependente do número de leucócitos circulantes (VAN ARMAN & CARLSON, 1974; Di ROSA *et al.*, 1971). Considerando que a resposta inflamatória desencadeada pela administração das DvL e Vmac na cavidade peritoneal foi um processo dependente da secreção de mediadores inflamatórios por células residentes, decidiu-se investigar a participação dos leucócitos na resposta edematogênica induzida pelas duas lectinas utilizadas. Assim, foi demonstrado que o tratamento com o metotrexate, uma droga imunossupressora, reduziu significativamente o número de leucócitos totais sendo mais acentuada a redução de polimorfonucleares (PMN) do sangue periférico. A sugestão do envolvimento de leucócitos, principalmente de PMN no efeito edematogênico das duas lectinas foi consistente com o fato de que o edema de pata da DvL e Vmac foi significativamente reduzido nestas condições. Esta idéia foi confirmada com a análise histopatológica das patas dos animais tratados com as lectinas, que demonstra um aumento de infiltrado celular.

O efeito inibitório por carboidratos específicos é um modelo clássico de demonstrar o envolvimento do domínio lectínico na atividade biológica de uma lectina. Nesse sentido, no presente trabalho foi analisado o efeito inibitório dos açúcares:  $\alpha$ -metil-D-manosídeo e  $\alpha$ -D-galactose, inibidores específicos da DvL e Vmac, respectivamente, sobre a migração de neutrófilos induzida por estas proteínas no modelo de pemoite. A associação da DvL ao  $\alpha$ -metil-D-manosídeo resultou na inibição em 42% da migração de neutrófilos desencadeada por esta lectina, sendo que em relação a Vmac, observou-se redução deste efeito em 35%, quando

associada à  $\alpha$ -D-galactose. É importante ressaltar que  $\alpha$ -metil-D-manosídeo e  $\alpha$ -D-galactose quando administrados i.p. não causam nenhum efeito sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal (resultados não mostrados). Com estes resultados ficou evidente de que o efeito estimulador sobre a migração de neutrófilos das duas lectinas deve ocorrer de forma indireta através da interação entre os domínios lectínicos presentes na DvL e na Vmac com receptores glicídicos localizados na membrana de macrófagos. Estas células ativadas devem liberar fatores que podem estar desencadeando uma cascata de quimiocinas *in vivo*. Além disso, a idéia de que a atividade pró-inflamatórias destas lectinas ocorra *via* reconhecimento de estruturas glicanas presentes nas superfícies de macrófagos, esta relacionada com as diferenças nos mecanismo pelos quais as DvL e Vmac induzem migração de neutrófilos, considerando que as duas lectinas além de reconhecerem diferentes carboidratos são diferentes estruturalmente.

A maneira de demonstrar a importância da estrutura tridimensional das proteínas para a função biológica que exercem é alterar esta estrutura e determinar o efeito que isto causa nesta função. As proteínas podem ser desnaturadas pelo aquecimento, embora a temperatura precisa na qual o processo ocorre possa variar e o seu efeito nem sempre seja irreversível. Com este objetivo, DvL e Vmac, em solução, foram aquecidas a 100 °C por 10 minutos. Observou-se que a desnaturação das duas proteínas bloqueou o efeito de ambas na migração de neutrófilos no modelo de peritonite. Além disso, este tratamento reverteu também a atividade hemaglutinante *in vitro* de DvL e Vmac (resultado não mostrado). Assim, fica evidente que a estrutura tridimensional destas proteínas é crítica para o exercício de suas funções pró-inflamatórias e hemaglutinantes. Este dados

contribuíram também para excluir a hipótese de que a migração de neutrófilos induzida por DvL ou Vmac fosse devido à contaminação com LPS.

Muitas lectinas mostram-se sensíveis à presença de íons metálicos para exibirem suas atividades (VASCONCELOS *et al.*, 1991). Tem sido demonstrada o envolvimento de sítios específicos para metais na estabilização do complexo lectina-receptor (LORIS *et al.*, 1993). Os íons, principalmente  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mn}^{+2}$ , quando ligados a seus sítios parecem exercer um efeito estabilizador no sítio de ligação a carboidratos, o que explica porque a ConA e outras lectinas desmetalizadas não interagem com carboidratos (VASCONCELOS *et al.*, 1991). Com a finalidade de verificarmos a importância da estabilização do complexo DvL-ligante na manifestação de sua atividade pró-inflamatória, após ser quelada com EDTA a DvL foi testada no modelo de peritonite. Verificou-se que o bloqueio do sítio de ligação a metais reverteu totalmente a migração de neutrófilos induzida por esta proteína. Estes dados são sugestivos de que para a DvL exercer sua atividade pró-inflamatória é necessário que os sítios de ligação a metais presentes nesta proteína estejam ocupados com íons e assim estabilizando a ligação da lectina com seu ligante.

Esta bem demonstrado na literatura que as diversas atividades biológicas exercidas pelas lectinas ocorre devido ao fato destas reconhecem e interagem com estruturas glicanas complexas presentes em glicoproteínas. Ademais, alguns estudos têm demonstrado que o sítio de reconhecimento e interação com monossacarídeos tem um papel chave na ligação dessas estruturas complexas. Desta forma, uma simples unidade monossacarídica, pertencente à estrutura, é reconhecida pela lectina e complexa-se com seu sítio ativo, além disso, são estabelecidas interações não covalentes na interface entre as duas moléculas, as

quais estabilizam a ligação da lectina ao seu receptor.(BOURNE *et al.*, 1992; BOURNE *et al.*, 1994). Desta forma, é evidente, que cada lectina apresente uma maneira específica de associar-se com seus ligantes, e estas diferenças estão relacionadas com o sítio de ligação a carboidrato.

Neste trabalho, demonstramos que as lectinas de sementes de *Dioclea violacea* (DvL) específica por glicose-manose e de *Vatairea macrocarpa* (Vmac) específica por galactose exercem efeito pró-inflamatório induzindo migração de neutrófilos em cavidades peritoneais, bolsa de ar subcutânea e na pata. Além disso ficou sugerido que a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida pela DvL ou Vmac ocorre através da liberação de citocinas por células residentes. Apesar das duas lectinas induzirem um mesmo tipo de atividade biológica a análise comparativa dos resultados obtidos mostrou diferentes padrões de resposta. Estes resultados são coerentes considerando que a DvL e Vmac, além de reconhecerem diferentes ligantes presentes na superfície celular, apresentam também diferenças estruturais. Entretanto, mais investigações são necessárias para determinar, com mais clareza os mecanismos pelos quais as duas lectinas utilizadas exercem suas atividades pró-inflamatórias.

Finalmente, os resultados obtidos neste estudo, somados aos dados da literatura, mostram que a resposta inflamatória envolve uma série de reações complexas e que, apesar de atuar sempre no sentido de destruir, diluir ou bloquear o agente agressor, pode apresentar variações quantitativas de acordo com as características do tecido lesado ou órgão afetado, do agente lesivo e das condições fisiológicas do organismo (SEDGWICK & WILLOUGBY, 1985). Desta forma, para buscar meios de controlar a resposta inflamatória é necessário que haja uma melhor

compreensão de seus mecanismos. Nesse sentido, as lectinas se mostram ferramentas promissoras.

## V. CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados pelo presente trabalho pode-se concluir que:

1. As lectinas de sementes de *Dioclea violacea* (DvL) e *Vatairea macrocarpa* (Vmac) apresentam atividade pró-inflamatória no modelo de peritonite, edema de pata e bolsa de ar subcutânea;
2. DvL e Vmac, apesar de apresentarem quimiotaxia *in vivo* não são hábeis em induzir esta atividade *in vitro*;
3. A migração de neutrófilos induzida pela DvL e Vmac ocorre através de um mecanismo indireto, dependente de células residentes;
4. A Vmac induz o macrófago a liberar uma substância com atividade quimiotática para neutrófilos de peso molecular superior a 5000 Daltons;
5. A DvL quando incubada com células esplênicas totais induz a liberação de uma substância de peso molecular superior a 5000 Dalton;
6. As substâncias liberadas pelas células induzidas por Vmac ou DvL têm suas liberações e efeitos inibidos por dexametasona e talidomida, mas não por indometacina, MK-886, excluindo-se assim o envolvimento de metabólitos de cicloxigenase e de lipoxigenase como mediadores;
7. A atividade quimiotática para neutrófilo da substância liberada por macrófagos estimulados com Vmac é inibida com o anticorpo anti-TNF- $\alpha$ , sugerindo assim o possível envolvimento desta citocina;
8. A atividade quimiotática da substância liberada pela cultura de células esplênicas totais induzidas por DvL é inibida pelos anticorpos anti-IL-1 e anti-TNF- $\alpha$ , sugerindo que a resposta inflamatória desta lectina seja multimedida por estas citocinas;

9. O edema de pata induzido por DvL e Vmac é reduzido em ratos leucopênicos e o histopatológico das patas mostra infiltrado celular, sugerindo o envolvimento de leucócitos;
10. DvL e Vmac parecem induzir quimiotaxia por diferentes mecanismos, entretanto as duas proteínas agem através da interação de seus domínios lectínicos com glicoproteínas presentes na membranas de células residentes;
11. A manutenção da estrutura terciária de DvL e Vmac e os sítios de ligações a metais presentes na DvL são importantes para a execução de suas atividades biológicas;

## VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D.O. & KOERNER, T.J. Gene regulation in macrophage development and activation. **Year Immunol**, v. 4, p. 159 – 181, 1988.

ADAMS, D.D. Molecular interactions in macrophages activation. **Immunol Today**, v.10, p.33. 1989.

ALENCAR, N. M. N.; TEIXEIRA; E. H., ASSREUY, M. A. S.; CAVADA, B. S., FLORES, C. A., RIBEIRO, R. A., Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediators Inflamm**, v. 8, p. 107-113, 1999.

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

APPELBERG, R. T cell regulation of the peritoneal neutrophilia during mycobacterial infection. **Clin. Exp. Immunol**, v. 89, p.120, 1992.

ASSREUY, M. A. S., ALENCAR, N.M.N., CAVADA, B. S.; J.J.CALVETE; CUNHA, F.Q and RIBEIRO, R. A. Pró-inflammatory effect induced by spermadhesin PSPI/PSPII. **Eur J. Biochem**, 2001 (submetido)

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

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

AUPHAN, N.; DIDONATO, J.A.; ROSETTE, C.; HELMBERG, A. and KARINS, M. Immunosuppression by glucocorticoids: Inhibition of NF- $\kappa$ B activity through induction of I $\kappa$ B synthesis. **Science**, v. 270, p. 286-289, 1995.

BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B. and MOSER, I. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines – CXC and CC chemokines. **Adv. Immunol**, v. 55, p. 97-179, 1994.

BARBOSA, T., ARRUDA, S., CAVADA, B. S., RODRIGUES, L. A., GRANGEIRO, T. B., BARRAL-NETO, M. Lymphocyte activation and apoptosis induction in BALB/c mice treated with plant lectins. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.**, 2001 (In Press).

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

BARNES, P.J. & ADCOCK, I. Antiinflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 14, p. 436-441, 1993.

BARONDES, S.H., COOPER, D.N.W., GITT, M.A. Galectins. Structure and functions of a large family of animal lectins. **J. Biol. Chem.**, v.269, p. 20807-20810, 1994.

BARRA-NETO, M.; SANTOS, S.B.; BARRAL, A.; MOREIRA, L.I.M.; SANTOS, C.F.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A. and CAVADA, B.S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleae tribe. **Immunological Invest**, v.21(4), p. 297-303, 1992.

BAUHMANN, H. & GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunol today**, v. 15 (2), p. 74-80, 1994.

BECKER, J. W.; REEKE, G.N.; WANG, J.L.; CUNNINGHAM, B.A. and EDELMAN, G.M. The covalent and three-dimensional structure of concavalin A. III. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides. **J. Biol. Chem**, 250, p. 1513-1524, 1975.

BEM-BARUCH, A.; MICHIEL, D.F. and OPPENHEIM, J.J. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. **J. Biol. Chem**, v. 270 (20), p. 11703 – 11706, 1995.

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

BEUTH, J., KO, H.J., ROSZKOWSKI, W., ROSZKOWKI, K. and OHSHIMA, Y. Lectins: mediators of adhesion for bacteria in infections disease and for tumor cells in metastasis **Int. J. Med. Microbiol**, v.274, p. 350-358, 1990.

BEUTLER, B. & CERAMI, A. Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediators **Annu. Rev. Biochem**, v.57, p. 505, 1988.

BEUTLER, B.; KROCHIN, N.; MILSARK, I.W.; LUERDKE, C. and CERAMI, A. Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. **Science**, v. 232, p. 977-980, 1986.

BEVILACQUA, M.P.; NELSON, R.M.; MANNORI, G. Endotelial -leukocyte adhesion molecules in human disease. **Annu Rev Med**, v.45, p. 361-378, 1994.

BEZOUKA, K. VLAHAS, G. HORVATH, O. Rat natural killer cell antigen, NKR-P1, related to C-type animal lectins is a carbohydrate-binding protein. **J. Biol. Chem**, v. 269, p. 16945-16952, 1994.

BISCHOFF, S.C.; BRUNNER, T.; WCK, AL and DAHINDEN, CA. Interleukin-5 modifies histamine release and leukotriene generation by human basophils in response to diverse agonists. **J.Exp. Med.** V. 172, p.1577-82, 1990.

BLASCO, E.; BARRA, A.; NICOLAS, M.; LECRON, J.C; WIJDENES, J. and PREUDHOME, J.L. Proliferative response of human CD4+ T lymphocytes stimulated by the jacalin. **Eur. J. Immunol**, v.25, p. 2010-2018, 1995.

BOURNE, Y.; ROUGE, P. and CABBILLAU, C. X-ray structure of a biantennary octasaccharide-lectin complex refined at 2.1 Å resolution. **J. Biol. Chem.**, v. 267 (1), p. 197-203, 1992.

BOURNE, Y; MAZURIER, J.; LEGRAND, D.; ROUGE, P.; MOTREUIL, J.; SPIK, G. and CABBILLAU, C. Structure of a legume lectin complexed with the human lactotransferin N2 fragment, and with an isolated biantennary glycopeptide: role of the fucose moiety. **Structure**, v. 2, p. 209-219, 1994.

BRANDT, E.; ERNST, M. and FLAD, H.H. Interleukine-8. In: THOMSON, A. W. Ed. The cytokine handbook. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1994, chap. 10, p.303-318.

BROIDE, D.H. Inflammation cells: Structure and Function: Em **Basic and Clinical Immunology**. STITES, D.D. & TERR, A.I. (ed). Appleton and Lange. P. 141-183, 1991.

BROWNING, J.L.; NGAM-EK, A.; LAWTON, P.; DeMARINIS, J.; TIZARD, R.; CHOW, E.P.; HESSION, C.; GRECO, B.; FOLEY, S. and WARE, C.F.. Tumor necrosis factor Beta/Lymphotoxin-Alpha. In: THOMSON, A. W. Ed. The cytokine handbook. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1994, chap. 17, p.303-318.

ÇALVETE, J.J.; SANTOS, C.F; MANN, K.; GRANGEIRO, T.B.; NIMTNZ, N and CAVADA, B.S. primary structure and posttranslational processing of Vatairea macrocarpa seed lectin. **J. protein chem**, v. 17, p. 545-547, 1998.

CAVADA, B.S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S. GRANGEIRO, T.B. and BARRAL-NETO, M. Revisiting Proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological use of the Diocleinae subtribe lectins. **Curr Prot Peptide Science**, 2001( submetido).

CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, R.A. and GRANGEIRO, T.B. Primary structures and functions of plant lectins. **R. Bras. Fisiol. Veg**, v.5 , p. 193-201, 1993.

COSTA, J.J. and GALLI, S.J. Mast cells and basophils. Em: RICH, R.; FLEISHER, T.A.; SCHWARTZ, B.D.; SHEARER, V.V.T and STROBER, W. (ed) **Clinical Immunology : Principles and Practice** . St. Louis, Mosby-year book Inc; 408 –430, 1998.

COSTA, J.J.; WELLER, P.F. and GALLI, S.J. Células da Resposta Imunológica. **JAMABrasil**, v. 5 (2), p. 768 –778, 1997.

CRONSTEIN, B.N. and WEISSMAN, G. The adhesion molecules of inflammation. **Arthritis RheumN**, v. 136, p.147-157, 1993.

CUNHA, F. Q., FERREIRA, S. H., The release of a neutrophil factor from peritoneal macrophage by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 129, n. 1-2, p. 65-76, 1986.

DEBRAY, H., DECOUT, D., STRECKER, G., SPIK, G. and MONTREUIL, J. Specificity of twelve lectins toward oligosaccharides and glycopeptides related to N-glycosylproteins. **Eur. J. Biochem.** v.117, p.41-55, 1981.

DESREUMAUX, P. & CAPRON, M. Eosinophils in Allergic reactions. **Curr. Opin Immunol.** v.8, p. 790 –795, 1996.

DeVRIES, M.E.; RAN, I. and KELVIN, J.D. On the edge: The physiological and pathophysiological role of chemokines during inflammation and immunological responses. **Seminars In Immunology**, v.11, p. 95-104, 1999.

Di ROSA, M., GIROUD, J. P., WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenin and turpentine. **J. Pathol.**, v. 104, p. 15-29, 1971.

DIAS-BARUFFI, M.M.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. and ROQUE-BARREIRA, M.C. Macrophages –released neutrophil chemotactic factor (MNCf) induces PMN-neutrophil migration through lectin-like activity. **Agents. Actions**, v.38, p. C54, 1993.

DINARELLO, C.A. & WOLF, S.M. Mechanisms of disease: the role of interleukin in disease. **N. Eng. J. Med**, v. 328, p. 106; 1993.

DINARELLO, C.A.; CANNON, J.G.; WOLF, S.M. Tumor necrosis factor (Cachectin) in an endogenous pyrogen and induces interleukin-1. **J. Exp. Med.** v. 163, p.1433, 1986.

DRICKAMER, K. and TAYLOR, M.E. Biology of animal lectins. **Annu. Rev Cell Biol.** v. 9, p. 237-264, 1993.

DRICKAMER, K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. **J. Biol. Chem**, v.239, p. 9557-9560, 1988.

DURUM, S.K. & OPPENHEIM, J.J. Macrophages-derived mediators: IL-1, TNF, IL-6 and related cytokines. In: PAUL, W.E. ed. **Fundamental Immunology**, Raven press, New York, cap. 22, p. 639, 1989.

EDELMAN, G.M. and WANG, J.L. Binding and functional properties of concanavalin A and its derivatives. III. Interactions with indoleacetic acid and other hydrophobic ligands. **J. Biol. Chem.**, v.253, p. 3016-3022, 1978.

EPPIHIMER, M.J.; WOLITZKY, B.; ANDERSON, D.C.; LABOW, M.A. and GRANGER, D.N. Heterogeneity of expression of E- and P-selectins *in vivo*. **Circ. Res.**, v.79, p. 560-569, 1996.

ETZLER, M.E. Distribution and function of plant lectins. In: **The lectins: Properties, functions, and applications in biology and medicine**. LIENER, I.E.; SHARON, N. and GOLDSTEIN, I.J. Orlando, FL: Academic Press, p 371-435. 1986.

FACCIOLI, L.H.; SOUZA, G.E.P.; CUNHA, F.Q.; POOLE, S. and FERREIRA, S.H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration *in vivo* by indirect mechanism. **Agents Actions**, v.30, p. 344, 1990.

FREEDLAND, H.S.; SCHLEIMER, R.P.; SCHULMAN, E.S; LICHTENSTEIN, L.M.; PETERS, S.P. Generation of leukotriene B<sub>4</sub> by human lung fragments and purified human lung mast cells. **Am.Rev.Respir. Dis.**, v.138, p. 389-394, 1988.

FRIES, J.W.; WILLIAMS, A.J.; ATKINS, P.C.; NEWMAN, W. ; LIPSCOMB, M.F. and COLLINS, T. Expression of VCAM-1 and E-selectin in an *in vivo* model endothelial activation. **Am. J. Pathol.**, v.143, p. 725-737, 1993.

GARCIA-ZEPEDA, E.A., COMBADIERE, C and ROTHENBERG, M.E. Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptor (CCR)- 2 and 3. **Immunol**, v.157, p. 5613-26, 1996.

GÄTNER, F.; LEIST, M.; KUSTERS, S.; VOGT, K.; VOLK, H.D. and TIEGS, G.T. Cell stimulus-induced crosstalk between lymphocytes and liver macrophages results in augmented cytokine release. **Exp. Cell Res.**, v.229, p. 137-146, 1996.

GERSHON, R.K. and KONDON, K. Immunology of cytokines: an introduction In: THOMSON, A. W. Ed. **The cytokine handbook**. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1994, chap. 1, p.2-19.

GOMES, J.C.; FERREIRA, R.R.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A. and OLIVEIRA, J.T.A. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans: comparison with concanavalin A. **Agents Actions**, v.41, p. 132-135, 1994.

GORDON, J.R. & GALY, S. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF- $\alpha$ /cachectin. **Nature**, v.346, p. 274-276, 1990.

HARDMAN, K.D. ; AGARWAL, R.C. and FREISER, M.J. Manganese and calcium binding sites of Concanavalin A. **J. Mol. Biol.**, v.157, p. 69-89, 1982.

HOLGATE, S.T.; ROBINSON, C. and CHURCH, M.K. Mediators of immediate hypersensitivity. Eds: MIDDLETON, E. JR.; REED, C.E.; ELLIS, E.F.; ADKINSON, N.F.; YUNGINGER, J.W. and BUSSE, W.V.V. eds. **Allergy: Principles and Practice**. 4th, ed. St. Louis, Mo: Mosby – Year Book Inc; 267 –301, 1993.

KELM, S. SCHAUER, R. and CROCKER, P.R. The sialoadhesins – a family of sialic acid-dependent cellular recognition molecules within the immunoglobulin superfamily. **Glycoconj. J.**, v.13, p. 913-926, 1996.

KLEIN, A.; CUNHA, F.Q. and FERREIRA, S.H. The role of lymphocytes in the neutrophil migration induced by ovalbumin in immunized rats. **Immunology**, v.84, p. 577-584, 1995.

KLUTH, D.C. and REES, A.J. Inhibiting inflammatory cytokines. **Semin nephrol**, v. 16 (6), p. 576-582, 1996.

KUBES, P.; SUZUKI, M. and GRANGER, D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc. Natl. Acad. Sci**; v.88, p. 4651-4655, 1991.

LANDUCCI, E. C. T., ANTUNES, E., DONATO, J. L., FARO, R., HYSLOP, S., MARANGONI, S., OLIVEIRA, B., CIRINO, G., De NUCCI, G. Inhibition of carrageenin - induced rat paw oedema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A<sub>2</sub>. **Br. J. Pharmacol.**, v. 114, p. 578-583, 1995.

LARRICK, J.W.; KUNKEL, S.L. The role of tumor necrosis factor and interleukine-1 in the immunoinflammatory response. **Pharmacol. Res.** v.5 (3), p. 129-139, 1988.

LO,S.K.; LEE,S.; RAMOS, S.A.; LOBB, S. ; ROSA, M.; CHI-ROSSO,G. and WRIGHT, S.D. Endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 stimulates the adhesive activity of leukocyte integrin CR3 (CD11b/CD18, Mac-1) on human neutrophils.**J. Exp. Med**, v.173, p. 1493, 1991.

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

LUSTER, A.D. Chemokines –Chemotactic cytokines that mediated inflammation. In: EPSTEIN, F.H. Mechanisms of disease. **The New England J. Med.** V.12, p. 437-445, 1998.

MacDERMONT, R.P., BRADGON, M.J., KODNER,I.J., BERTOVICH,M.J., Deficient cell-mediated cytotoxicity and hyporesponsiveness to interferon and mitogenic lectin activation by inflammatory bowel disease peripheral blood and intestinal mononuclear cells. **Gastroenterology**, v.90, p. 6-11, 1986.

McEVER, R.P. Leukocyte-endothelial cell interactions. **Curr. Biol**, v.4, p. 840-849, 1992.

MOREIRA, A.L.; SAMPAIO, E.P.; ZMUIDZINAS, A.; FRINDT, P.; KENDALL, A. and KAPLAN, G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor  $\alpha$  enhancing mRNA degradation. **J. Exp.Med**, v.177, p. 1675-1680, 1993.

MOREIRA, R.A.; CORDEIRO, E.F.; RAMOS, M.V.; GRANGEIRO, T.B.; MARTINS, J.L. and CAVADA, B.S. Isolation and partial characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea violacea* Mattius (Ex Benth) .**R. Bras. Fisol. Veg**, v. 8(1), p.23-30, 1996.

NAGAHORA, H., HARATA, K., MURAKI, M. and JIGAMI, Y. Site-directed mutagenesis and sugar-binding properties of the wheat germ agglutinin mutants Tyr73Phe and Phe116Tyr. **Eur. J.Biochem**, v. 233, p. 27-34 , 1995.

NETA, R.; SAYERS, T. and OPPENHEIM, J.J. In: **Tumor necrosis factor: structure , functions and mechanism of action**. Eds. Aggarwal, B.B. and Vilcek,j.; Inc. New York; p. 499-566, 1992.

NORIN, A.J., DE PINHO, R.A. Rate and deficiency of complement-dependent phagocytosis in cytosolic and non-cytosolic inflammatory macrophages. **Immunology**, v.58, p. 561-568, 1986.

OGLE, C. K., WU, J.-Z., MAO, X., SZCZUR, K., ALEXANDER, J. W., OGLE, J. W. Heterogeneity of kupffer cells and splenic, alveolar, and peritoneal macrophages for the production of TNF, IL-1, and IL-6. **Inflammation**, v. 18, p. 511-523, 1994

OLD, L.J. Tumor necrosis factor (TNF). **Science**, v.30, p.: 630, 1985.

PAN, J.; XIA, L.; YAO, L. and MCEVER, R.P. Tumour necrosis factor-alpha- or lipopolysaccharide-induced expression of the murine P-selectin gene in endothelial cells involves novel Kappa B sites and a variant activating transcription factor/Camp response element. **J. Biol. Chem**, v.273, p. 10068 – 10077. 1998.

PANÉS, J.; PERRY, M. and GRANGER, N. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. **Br J. Pharmacol**, v.126, p. 537 –550. 1999.

PAUL, N.L. & RUDDLE, N.H. Tumor necrosis factor Beta/Lymphotoxin-Alpha. In: THOMSON, A. W. Ed. The cytokine handbook. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1994, chap. 17, p.303-318.

PEACOCK, J.S., COLSKY, A.S. and PINTO, V.B. Lectins and antibodies as tools for studying cellular interactions **J. Immunol.** V.126, p. 147-157, 1990.

PEUMANS, W.J., VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defence proteins. **Plant Physiol** v.109, p. 347-352, 1995.

PEUMANS, W.J. and VAN DAMME, E.J.M. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. In: Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, v. 15, p.199-228, 1998.

PHILLIP, R. & EPSTEIN, L.B. Tumor necrosis factor as immunomodulator and mediator of monocyte cytotoxicity induced by itself, gamma-interferon and interleukin 1. **Nature**, v.323, p. 86, 1986.

RAMOS, M.V., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, J.T.A., CAVADA, B.S. and ROUGÉ, P. The carbohydrate-binding specificity and molecular modelling of *Canavalia maritima* and *Dioclea grandiflora* lectins. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.96(6), p. 761-766, 1996a.

RAMOS, M.V., MOREIRA, R.A., CAVADA, B.S OLIVEIRA, J.T.A. and ROUGÉ, P. Interaction of the lectins from sub-tribe Diocleinae with specific ligands. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 8(3), p. 193-199, 1996b.

RAMOS, V.R.; CAVADA, B.S.; CALVETE, J.J.; SAMPAIO, A. H.; MAZARD, A.M.; BARRE, A.; THALLES, B.G.; FREITAS, B.T.; LEITE, B.H. and ROUGÉ, P. Specificity of the *Vatairea macrocarpa* lectin towards glycans exhibiting exposed Gal/GalNAc residues. **Proteina and peptides letters**, v. 5 (3),p. 163- 171, 1999.

RAMOS, M.V.; BOMFIM, R.L.; CAVADA, B.S.; ALENCAR, N.M.N.; GRANGEIRO, T.B. and DEBRAY, HENRI. Further characterization of the glycan-binding specificity of the seed lectin from *Vatairea macrocarpa* and its dependence of pH. **Proteins and peptides letters**, v. 7(4) p. 241-248, 2000-a

RAMOS, M. V., TEIXEIRA, C. R., LOPES, R. O. D., CAVADA, B. S. Evaluation of the proteolytic susceptibility of three lectins from subtribe Diocleinae using enzymatic action, heat treatment and molecular modeling. **J. Food Biochem.**, v. 23, n. 5, p. 559-570, 2000-b

RANKI, J.A.; SYLVESTER, I.; SMITH, S.; YOSHIMURA, T. and LEONARD, E.J. Macrophages cultured *in vitro* release leukotriene B4 and neutrophil attractant activation protein (interleukin-8) sequentially in response to stimulation with lipopolysaccharide and zymosan. **J. Clin. Invest.** V.80, p. 1554-1564, 1990.

RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q. and FERREIRA, S.H. Recombinant gamma interferon causes neutrophil migration mediated by the release of a macrophage neutrophil chemotactic factor. **Int. J. Exp. Pathol**, v.71, p. 717, 1990.

RIBEIRO, R. A., FLORES, C. A., CUNHA, F. Q. and FERREIRA, S.H. IL-8 causes *in vivo* neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. **Immunology**, v. 73, p. 472-477, 1991.

RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. and DeLUCCA. Partial characterization of the RNA from LPS-stimulated macrophages that induces the release of

chemotactic cytokines by resident macrophages. **Mol. Cell. Biochem**, v.148, p. 105-113, 1995.

RIBEIRO, R. A.; SOUZA-FILHO, M.V.P; SOUZA, M.H.L.P.; OLIVEIRA, S.H.P.; COSTA, C.H.S.; CUNHA, F. Q and FERREIRA, S.H. Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB<sub>4</sub>, fMLP and C5a des arg. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 112, p. 27-35, 1997.

RINI, J.M. and LOBSANOV, Y.D. New animal lectin structures. **Curr Opin in Structural biology**, v.9, p. 578-584, 1999.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V. **Pathologic basis of diseases**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1994. Cap. 3 : Inflammation and repair.

ROBINSON, D.S.; DURHAM, S.R. AND KLY A.B. Cytokines in asthma. **Thorax**, v.48, p. 845, 1993.

ROCHA E SILVA, M.O. A brief history of inflammation. Em: VANE, J.R. & FERREIRA, S.H. **Handbook of Experimental Pharmacology**. Springer-Verlag. V. 50 (1), p. 6-25, 1978.

RODRIGUEZ, D.; CAVADA, B.S; OLIVEIRA, J.T.A and RUSSO, M. Differences in macrophages stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose-mannose-binding plant lectins. **Braz. J. Med. Biol. Res**; v.25, p. 823, 1992.

RUDDLE, N.H. Tumor necrosis factor Beta/Lymphotoxin-Alpha. In: THOMSON, A. W. Ed. **The cytokine handbook**. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1994, chap. 17, p.303-318.

SANZ-APARICIO, J., HERMOSO, J., GRANGEIRO, T.B., CALVETE, J.J. and CAVADA, B.S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties foram Concanavalin A. **FEBS Lett**, v.405, p. 114-118, 1997.

SCHWARTZ, L. & HUFF, F. Biology of mast cells and basofils. Em: MIDDLETON, E. JR; ELLIS, E.F.; ADKINSON, N.F.; YUNGINGER, J.V.V. and BUSSE, W.W. ed. **Allergy: Principles and Practice**. 4ed. St Louis, Mo: Mosby-Year Book Inc. 135 –168, 1993.

SEDGWICK, D. & WILLOUGHBY, D.A. Initiation of inflammatory response and its prevention. Em BONTA, I.L.; BRAY, M.A. & PARNHAM, M.J. **Handbook of Inflammation**. Elsevier. V.5, p. 27-47, 1985.

SHARON, N and LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Articles**, v.13, p. 272-233, 1989.

SHIRAKAWA, F.; TANAKAY, Y. and ETO, S. Effect of IL-1 on the expression of IL-2 receptor (the antigen) on human natural killer cell and natural killer-like cell line (YT) cells. **J. Immunol.** V.137, p. 551, 1986.

SKLAR, L. A.Ligand-receptor dynamics and signal amplification in the neutrophil. **Adv. Immunol.**, v.39, p. 95, 1986.

SOUZA, C. A. M., FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Agents Actions.**, v. 17, n. 1, p. 97-103, 1985.

SOUZA, G .E. P., CUNHA, F. Q., MELLO, C. R., FERREIRA, S. H. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents Actions.**, v. 24, n. 3- 4, p. 377-380, 1988.

SPRINGER, T.A. Cell adhesion. Sticky sugars for selectins. **Nature**, v.349, p. 197-197, 1991.

SPRINGER, T.A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell.** v. 76, p. 301 – 314, 1994.

STARUCH, M.J. and WOOD, D.D. Reduction of serum interleukin-1 like activity after treatment with dexamethasone **J. Leukoc Biol**, v.37, p. 193-207, 1985.

STITES, D.P. and TERR,A.I. **Imunologia Básica**. Rio de Janeiro: Editora Prentice-Hall do Brasil Ltda. 1992. 187p.

TAKEMURA, R. & WERB, Z. Secretory products of macrophages and their physiological functions. **Am. J. Physicol.** V. 246 (15), 1984.

TAPPER, H. The secretion of preformed granules by macrophages and neutrophils. **J. Leukoc. Biol.**, v.59, p. 613- 622, 1996.

TATAKIS, D.N. Interleukin-1 and bone metabolism: a review. **J. Periodontol.**, v. 64 (5), p. 416-431, 1993.

TAYLOR, M.E., BRICKELL, P.M., CRAIG, R.K. Structure and evolutionary origin of gene encoding a human manose-binding protein. **Biochem. J.**, v.262, p. 763-771, 1989.

TEDDER, T.F.; STEEBER, D.A.; CHEIN, A. and ENGEL, P. The selectin: vascular adhesion molecules. **FASEB J.**, v.9, p. 866- 873, 1995.

UNANUE, E.R. & ALLEN, P.M. The basis for the immunoregulatory role macrophages and others accessory cells. **Science**, v. 236, p.551, 1987.

VAN ARMAN, C.G. and CARLSON, R.P. Anti-inflammatory drugs and the behaviour of leukocytes . In **Future Trends in inflammation**. Ed. G.P. VELO; WILLOUGHBY, D. A. and GIROUND, J.P. . Padua: Piccin Medical, 1974.

VAN DAMME, E.J.M.;BRIKÉ, F.; WINTER, H.C.; VAN LEUVEN, F.; GOLDSTEIN, I.J. and PEUMANS, W.J. Molecular cloning of two different manose-binding lectin from tulip bulbs. **Eur. J. Biochem.** v.236, p. 419-427, 1996.

VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J.; BARRE,A. and ROUGÉ, P. Plant Lectin: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Crit Rev Plant Sciences**, 17(6), p. 575-692, 1998.

VAN FURTH, R. Origin and Turnover of monocytes and macrophages. **Curr. Top. Pathol.** V.79, p. 125, 1988.

VAN PARRIJS, J., BROEKAERT, W.E., GOLDSTEIN, J.I. Hevein: na antifungal protein foram rubber-tree (Hevein brasiliensis) latex. **Planta**, v. 183, p. 258-262, 1991.

VASCONCELOS, I.M.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; and OLIVEIRA, J.T.A. Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea guianensis*. **Journal of food Biochemistry**, v. 15, p. 137-154, 1991.

WALLAYS, G. and CEUPPENS, J.L. Human T lymphocytes activation by pokeweed mitogen induces production of TNF-alpha and GM-CSF and helper signaling by IL-1 and IL-6 results in IL2-independent Tcell growth **Eur. Cytokine Netw**; v. 2, p. 269-277, 1993.

WALZOG, B. & GAEHTGENS, P. Adhesion molecules : The path to a new understanding of acute inflammation. **News. Physiol. Sci.** , v.15, p.107-113, 2000.

WARE, F.E., VASSILAKOS, A., PETERSON, P.A. The molecular chaperone clanexin binds Glc1Man9GlcNAc2 oligosaccharide as an initial step in recognizing unfolded glycoproteins. **J. Biol. Chem**, v.270, p. 4697-4704, 1995.

WARNER, S.J.; AUGER, K.R. & LIBBY, P. Interleukin 1 induces interleukin 1. II recombinant human interleukin 1 induces IL-1 production by adult human vascular endothelial cells. **J. Immunol.** V.139, p. 1911, 1987.

WASSERMAN, S.I. Platelet activating factor as a mediator of bronchial asthma . **Hosp. Pract.** V.23, p. 49-56, 1988.

WEIS, W.I. & DRICKAMER, K. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. **Annu. Rev. Biochem.** v.65, p. 441-473, 1996.

WERB, Z.; CHIN, J.R. and TAKEMURA, R. The cell and molecular biology of apolipoprotein and synthesis by macrophages. **Biochemistry of macrophages: CIBA Foundation Symposium**, v.118; p. 155, 1986.

WHALEY, K. and FERGUNSON, A. Molecule aspects of complement activation. **Mol. Aspects med.** V.4, p. 209-273, 1981.

WILCKENES, T.; De RIJK, R. Glucocorticoids and immune function: Unknown dimensions and new frontiers. **Immun. Today**, v.18, p. 418-423, 1997.

WILLOUGHBY, D.A. and GIROUD, J.P. The role of polymorphonuclear leukocytes in acute inflammatory in agranulocytic rats. **J. Pathol**, v.98, p. 53, 1969.

YOSHIMURA, T; MATASUSHIMA, K. TANAKAR, S.; ROBINSON, E.A.; APPELLA, E.; OPPENHEIM, J.J.and LEONARD, E.J. Interleukine-8. In: THOMSON, A. W. Ed. The cytokine handbook. 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Academic Press, 1994, chap. 1o, p.303-318.