

IMUNOGENICIDADE DE FRAÇÕES PROTÉICAS DE *Artocarpus integrifolia* L. E IMUNOMODULAÇÃO EXERCIDA PELA JACALINA.

DEIJANIRA ALVES DE ALBUQUERQUE

---

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

FORTALEZA - 1987

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

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

---

Deijanira Alves de Albuquerque

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 14 / VIII / 87

---

Maria da Guia Silva Lima  
Orientador da Dissertação

---

Dirce Fernandes de Melo

---

Enéas Gomes Filho

*Ao meu filho*

*Lucas*

Este trabalho foi realizado graças a auxílios das seguintes instituições:

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

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

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

## AGRADECIMENTOS

À professora MARIA DA GUIA SILVA LIMA, pela orientação permanente, segura e objetiva, por sua amizade, com compreensão e constante incentivo durante a realização deste trabalho.

Aos professores DIRCE FERNANDES DE MELO e ENÉAS GOMES FILHO pelas valiosas sugestões apresentadas na elaboração desta dissertação.

Meus agradecimentos ao Dr. ÁRPÁD PUSZTAI pela ajuda na purificação da fração lectínica (jacalina) da semente em estudo.

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

Agradeço ao meu pai e minha mãe (*in memoriam*) pelo amor que sempre tiveram para comigo.

Finalmente sou grata ao MANOEL pelo apoio, incentivo e ajuda permanentes.

## SUMÁRIO

	Página
<u>LISTA DE FIGURAS</u> .....	ix
<u>LISTA DE TABELAS</u> .....	xi
<u>ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES</u> .....	xii
<u>RESUMO</u> .....	xiii
<u>ABSTRACT</u> .....	xiv
1 - <u>INTRODUÇÃO</u> .....	1
1.1 - <u>Proteínas Vegetais</u> .....	1
1.1.1 - Generalidades .....	1
1.1.2 - Proteínas de Sementes de <i>Artocarpus integrifolia</i> L. ....	2
1.2 - <u>Alérgenos</u> .....	3
1.2.1 - Aspectos Moleculares .....	3
1.2.2 - Alérgenos de Origem Vegetal .....	5
1.2.3 - Alergóides .....	6
1.3 - <u>Lectinas - Relação com a Imunologia</u> .....	10
1.4 - <u>Resposta Imunológica</u> .....	15
1.4.1 - Considerações Gerais .....	15
1.4.2 - Reações de Hipersensibilidade .....	15
1.4.3 - Anafilaxia .....	16
1.4.4 - Modulação da Síntese de Anticorpos Anafiláticos .....	18
1.5 - <u>Objetivo</u> .....	19
2 - <u>MATERIAIS E MÉTODOS</u> .....	20
2.1 - <u>Animais</u> .....	20
2.2 - <u>Antígenos de Origem Vegetal</u> .....	20
2.3 - <u>Teste de Hemaglutinação</u> .....	21
2.4 - <u>Adjuvante</u> .....	22
2.5 - <u>Reagentes</u> .....	22
2.6 - <u>Imunização por Via Subcutânea</u> .....	23

	Página
2.7 - <u>Obtenção de Antissoros</u> .....	23
2.8 - <u>Anafilaxia Cutânea Passiva</u> .....	24
2.8.1 - Reações de Anafilaxia Cutânea Passiva para IgG em Camundongos .....	24
2.8.2 - Reações de Anafilaxia Cutânea Passiva para IgE em Ratos .....	25
2.9 - <u>Esquema Experimental</u> .....	26
3 - <u>RESULTADOS</u> .....	28
3.1 - <u>Atividades Hemaglutinantes das Frações Protéi- cas de <i>Artocarpus integrifolia</i> L.</u> .....	28
3.2 - <u>Respostas dos Tipos IgG e IgE em Camundongos Imunizados por Via Subcutânea com Ovalbumina (OVA)</u> .....	29
3.2.1 - Resposta do Tipo IgG .....	29
3.2.2 - Resposta do Tipo IgE .....	32
3.3 - <u>Respostas dos Tipos IgG e IgE em Camundongos Imunizados por Via Subcutânea com a Fração Al- bumínica Total (AT)</u> .....	32
3.3.1 - Resposta do Tipo IgG .....	33
3.3.2 - Resposta do Tipo IgE .....	36
3.4 - <u>Respostas dos Tipos IgG e IgE em Camundongos Imunizados por Via Subcutânea com a Fração Al- bumínica Sem Lectina (ASL)</u> .....	36
3.4.1 - Resposta do Tipo IgG .....	39
3.4.2 - Resposta do Tipo IgE .....	39
3.5 - <u>Respostas dos Tipos IgG e IgE em Camundongos Imunizados por Via Subcutânea com a Fração Al- bumínica Processada (AP)</u> .....	40
3.5.1 - Resposta do Tipo IgG .....	40
3.5.2 - Resposta do Tipo IgE .....	40
3.6 - <u>Respostas dos Tipos IgG e IgE em Camundongos Imunizados por Via Subcutânea com a Fração Glo- bulínica Total (GT)</u> .....	41

3.6.1 - Resposta do Tipo IgG .....	41
3.6.2 - Resposta do Tipo IgE .....	44
3.7 - <u>Respostas dos Tipos IgG e IgE em Camundongos</u> <u>Imunizados por Via Subcutânea com a Fração Glo-</u> <u>bulínica Sem Lectina (GSL)</u> .....	45
3.7.1 - Resposta do Tipo IgG .....	46
3.7.2 - Resposta do Tipo IgE .....	46
3.8 - <u>Respostas dos Tipos IgG e IgE em Camundongos</u> <u>Imunizados por Via Subcutânea com a Fração Glo-</u> <u>bulínica Processada (GP)</u> .....	49
3.8.1 - Resposta do Tipo IgG .....	49
3.8.2 - Resposta do Tipo IgE .....	51
3.9 - <u>Respostas dos Tipos IgG e IgE em Camundongos</u> <u>Imunizados por Via Subcutânea com Ovalbumina em</u> <u>Ausência e Presença de Diferentes Doses da Fra-</u> <u>ção Lectínica Purificada (LP)</u> .....	51
3.9.1 - Resposta do Tipo IgG .....	51
3.9.2 - Resposta do Tipo IgE .....	54
4 - <u>DISCUSSÃO</u> .....	55
5 - <u>CONCLUSÕES</u> .....	66
6 - <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> .....	67
7 - <u>COMUNICAÇÕES A CONGRESSOS</u> .....	75

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	Mecanismo da reação mediada por IgE. A) com antígeno não glutarizado; B) com antígeno glutarizado .....	9
2	Controle do ciclo das células T .....	14
3	Reação de hipersensibilidade .. anafilática. Degranulação do mastócito após interação do antígeno com os anticorpos homocitotrópicos fixados .....	17
4	Resposta do tipo IgG em camundongos imuniza <u>dos</u> por via subcutânea com ovalbumina .....	30
5	Resposta do tipo IgE em camundongos imuniza <u>dos</u> por via subcutânea com ovalbumina .....	31
6	Resposta do tipo IgG em camundongos imuniza <u>dos</u> por via subcutânea com a fração albumí <u>nica</u> total (AT) .....	34
7	Resposta do tipo IgE em camundongos imuniza <u>dos</u> por via subcutânea com a fração albumí <u>nica</u> total (AT) .....	35
8	Resposta do tipo IgG em camundongos imuniza <u>dos</u> por via subcutânea com a fração albumí <u>nica</u> sem lectina (ASL) .....	37

FIGURA		Página
9	Resposta do tipo IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com a fração albumínica sem lectina (ASL) .....	38
10	Resposta do tipo IgG em camundongos imunizados por via subcutânea com a fração globulínica total (GT) .....	42
11	Resposta do tipo IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com a fração globulínica total (GT) .....	43
12	Resposta do tipo IgG em camundongos imunizados por via subcutânea com a fração globulínica sem lectina (GSL) .....	47
13	Resposta do tipo IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com a fração globulínica sem lectina (ASL) .....	48
14	Respostas dos tipos IgG e IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com a fração globulínica processada (GP). A) Resposta do tipo IgG; B) Resposta do tipo IgE .....	50
15	Resposta do tipo IgG em camundongos imunizados por via subcutânea com ovalbumina em ausência e presença de diferentes doses da fração lectínica purificada (LP) .....	52
16	Resposta do tipo IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com ovalbumina em ausência e presença de diferentes doses da fração lectínica purificada (LP) .....	53

LISTA DE TABELAS

TABELA		Página
1	Efeitos biológicos de lectinas .....	11
2	Atividades hemaglutinantes das frações proteícas de <i>Artocarpus integrifolia</i> L. ....	28

## ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

AP	Fração albumínica processada de <i>Artocarpus integrifolia</i> L.
ASL	Fração albumínica sem lectina de <i>Artocarpus integrifolia</i> L.
AT	Fração albumínica total de <i>Artocarpus integrifolia</i> L.
Con A	Concanavalina A
GP	Fração globulínica processada de <i>Artocarpus integrifolia</i> L.
GSL	Fração globulínica sem lectina de <i>Artocarpus integrifolia</i> L.
GT	Fração globulínica total de <i>Artocarpus integrifolia</i> L.
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
LP	Fração lectínica purificada de <i>Artocarpus integrifolia</i> L.
OVA	Ovalbumina
PCA	Anafilaxia cutânea passiva
PHA	Lectina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
U.H.	Unidade de hemaglutinação, definida como o inverso da maior diluição de uma solução que ainda é capaz de aglutinar uma suspensão de hemácias a 2% em NaCl 0,15 M com $Ca^{+2}$ 5 mM e $Mn^{+2}$ 5 mM.
WGA	Agglutinina do germe do trigo

## RESUMO

A resposta imunológica, em termos de síntese de IgG e de IgE específicas foi estudada em camundongos imunizados com doses crescentes de frações proteicas de sementes de *Artocarpus integrifolia* L.

A síntese de IgG revelada por títulos de anafilaxia cutânea passiva (PCA) foi mais alta com doses crescentes das frações albumínica e globulínica (1, 10 e 100 µg), excetuando a dose de 1 µg da fração albumínica que não induziu a síntese de IgG. A resposta IgG anti-globulinas apresentou-se mais elevada do que a resposta anti-albuminas de *Artocarpus integrifolia* L. No que diz respeito à síntese de IgE, as doses de 1 e 10 µg da fração globulínica e 10 µg da fração albumínica induziram síntese mais elevada desta imunoglobulina do que aquela induzida por 100 µg de ambas as frações.

Aparentemente, a lectina, jacalina, presente nas frações albumínica e globulínica não exerceu efeito modulador sobre a síntese de IgG induzida pelas proteínas de *Artocarpus integrifolia* L. contida nestas frações. Entretanto, a jacalina exerceu efeito modulador na síntese de IgE específica, dependente da dose. Baixas doses de jacalina estimularam a síntese de IgE e a alta dose inibiu-a.

O possível papel modulador exercido pela jacalina foi testado de duas maneiras: 1. usando-se a jacalina purificada associada a uma proteína não relacionada como a ovalbumina; 2. usando-se as frações albumínica e globulínica de *A. integrifolia* L. desprovidas de lectina (ASL e GSL). No primeiro caso, as doses de 5 e 50 µg de lectina não exerceram influência sobre a síntese de IgG anti-ovalbumina. No entanto, a dose de 5 µg de jacalina estimulou a síntese de

IgE anti-ovalbumina e a dose de 50  $\mu$ g inibiu-a. Por outro lado, no segundo caso, a s $\bar{i}$ ntese de IgG induzida pelas fra $\bar{c}$ o $\bar{e}$ s album $\bar{i}$ nica e globul $\bar{i}$ nica sem lectina (ASL e GSL) aumen $\bar{t}$ ou com o aumento das doses das respectivas fra $\bar{c}$ o $\bar{e}$ s prote $\bar{i}$ cas. A fra $\bar{c}$ o $\bar{e}$  GSL apresentou t $\bar{i}$ tulos de PCA semelhantes aos obtidos com a fra $\bar{c}$ o $\bar{e}$  globul $\bar{i}$ nica total (GT), enquanto que a fra $\bar{c}$ o $\bar{e}$  ASL mostrou t $\bar{i}$ tulos de PCA para IgG mais elevados do que os revelados para a fra $\bar{c}$ o $\bar{e}$  album $\bar{i}$ nica total (AT). A res $\bar{p}$ osta do tipo IgE espec $\bar{i}$ fica, para GSL ou ASL, nas doses de 10 e 100  $\mu$ g foram semelhantes, confirmando assim, o efeito imunomodulador, dependente da dose, exercido pela jacalina sobre a s $\bar{i}$ ntese destes anticorpos.

Estudos preliminares com as fra $\bar{c}$ o $\bar{e}$ s album $\bar{i}$ nica e globul $\bar{i}$ nica obtidas de sementes submetidas  $\bar{a}$  coc $\bar{c}$ o $\bar{e}$  (AP e GP), n $\bar{a}$ o revelaram s $\bar{i}$ ntese de IgE espec $\bar{i}$ fica. No tocante  $\bar{a}$  s $\bar{i}$ ntese de IgG, a fra $\bar{c}$ o $\bar{e}$  AP n $\bar{a}$ o induziu sua s $\bar{i}$ ntese. Con $\bar{t}$ udo, a fra $\bar{c}$ o $\bar{e}$  GP induziu s $\bar{i}$ ntese de IgG espec $\bar{i}$ fica com t $\bar{i}$ tulos de PCA compar $\bar{a}$ veis aos revelados com as fra $\bar{c}$ o $\bar{e}$ s GSL e GT (nativas). As fra $\bar{c}$ o $\bar{e}$ s AP e GP foram, contudo, capazes de desencadear rea $\bar{c}$ o $\bar{e}$ s de PCA para IgG, bem como para IgE em soros de animais sensibilizados com as fra $\bar{c}$ o $\bar{e}$ s GSL e ASL (nativas).

Os resultados indicaram que a fra $\bar{c}$ o $\bar{e}$  globul $\bar{i}$ nica das prote $\bar{i}$ nas de jaca  $\bar{e}$  dotada de maior capacidade imonog $\bar{e}$ nica do que a fra $\bar{c}$ o $\bar{e}$  album $\bar{i}$ nica em camundongos imunizados subcu $\bar{t}$ aneamente. A jacalina modula a resposta IgE e o tratamento pr $\bar{e}$ vio destas fra $\bar{c}$ o $\bar{e}$ s prote $\bar{i}$ cas pelo calor conduz a modi $\bar{f}$ ica $\bar{c}$ o $\bar{e}$ s da resposta do tipo IgG e do tipo IgE, sem destruir a antigenicidade das mesmas.

## ABSTRACT

The immunological answer in terms of specific IgG and IgE was studied in mice immunized with increasing doses of *Artocarpus integrifolia* L. protein fractions.

The IgG synthesis revealed by titles of passive cutaneous anaphylaxis (PCA) has been shown to be higher with increasing doses (1, 10 and 100  $\mu$ g) of the albumin and globulin fractions; unless the dose of 1  $\mu$ g of the albumin fraction that did not induce IgG synthesis. Concerning to the IgE synthesis the doses of 1 and 10  $\mu$ g of the globulin fraction and 10  $\mu$ g of the albumin fraction induced a higher synthesis of this immunoglobulin than the IgE synthesis induced by 100  $\mu$ g of both fractions.

Apparently, the lectin jacalin, present among the proteins of the albumin and globulin fractions did not exert modulating effect on the IgG synthesis induced by the proteins of these fractions of *A. integrifolia*. However, jacalin exerts an immunomodulating effect on the IgE specific synthesis that is dose-dependent. The low doses of jacalin stimulate the IgE synthesis and the higher doses inhibit such synthesis.

The possible modulating effect exerted by jacalin has been tested by two different ways; 1. by using purified jacalin associated with a non-related protein such as eggalbumin; 2. by using albumin and globulin fractions lectin-free of *Artocarpus integrifolia*. In the first case, the doses of 5 and 50  $\mu$ g of jacalin did not exert an influence on the synthesis of IgG against eggalbumin. However, 5  $\mu$ g of jacalin did stimulate the synthesis of IgE anti-eggalbumin and 50  $\mu$ g inhibited such synthesis. On the other hand, in the second case, the synthesis of IgG induced

by the albumin and globulin fractions depleted of lectin has been shown to increase according to the doses of the protein fractions. The globulin lectin-free fraction induced IgG PCA titles similar to those obtained with the total globulin fraction and the albumin lectin-free fraction presented IgG PCA titles higher than those revealed for the total albumin fraction. The specific IgE response for albumin and globulin lectin-free fractions with the doses of 10 e 100  $\mu$ g has been shown to be similar confirming then, the immune modulation dose-dependent exerted by jacalin on the synthesis of these antibodies.

Preliminary studies with albumin and globulin fractions obtained from boiled seeds did not reveal specific IgE synthesis. Concerning to the IgG synthesis the albumin fraction of the boiled seeds did not induce synthesis of such immunoglobulin. However, the globulin fraction of the boiled seeds did induce a synthesis of specific IgG with PCA titles comparable to those revealed by the native globulin and globulin lectin-free fractions. On the other hand, the albumin and globulin fractions from boiled seeds have been revealed to be capable of challenging PCA reactions either for IgG or for IgE with sera of mice immunized with albumin and globulin lectin-free native fractions.

The results indicate that the globulin fraction of jackfruit has a more strong immunogenic capacity than the albumin fraction for subcutaneous immunization of mice. Jacalin modulates the IgE response and the previous treatment of these protein fractions by heating leads to modifications of the IgG and IgE responses without destroying the antigenicity of them.

## 1 - INTRODUÇÃO

### 1.1 - Proteínas Vegetais

#### 1.1.1 - Generalidades

O conhecimento das propriedades físico-químicas e biológicas das proteínas de origem vegetal tem aumentado de interesse, sobretudo tendo em vista seu emprego potencial na alimentação animal (inclusive humana) (GATEHOUSE, 1984). Contudo, o estudo destas proteínas, como aliás a totalidade da bioquímica vegetal, ainda se apresenta bastante defasado, quando se compara ao estudo de sistemas de mamíferos. (HATCH, 1986).

Investigações realizadas sobre as proteínas vegetais têm demonstrado que, embora as plantas possam representar uma fonte rica em proteínas, eventualmente de alto valor nutritivo para sua utilização na alimentação animal (inclusive humana), estudos mais criteriosos sobre as características químicas e as propriedades biológicas destas proteínas devem ser realizados. É sabido que, dentre as proteínas vegetais, os inibidores de enzimas digestivas, as lectinas (fitoemaglutininas) e os antígenos (ou alérgenos vegetais) possuem especial relevância (PUSZTAI, 1986). Tendo-se em consideração o aspecto do estudo dos antígenos de origem vegetal, sabemos que é limitado o seu conhecimento (PERLMAN, 1980).

### 1.1.2 - Proteínas de Sementes de *Artocarpus integrifolia* L.

As proteínas de sementes de *Artocarpus integrifolia* L. foram inicialmente estudadas do ponto de vista químico e imunoquímico, em virtude de sua importância como proteínas de origem vegetal (OLIVEIRA, 1980; MOREIRA & OLIVEIRA, 1983a) e pelo fato da existência entre estas proteínas de uma lectina (MOREIRA & AINOZ, 1978), que foi parcialmente purificada por cromatografia de afinidade de estroma de hemácias do grupo AB<sup>+</sup> (OLIVEIRA, 1980; MOREIRA & OLIVEIRA, 1983b). Segundo análise das proteínas das frações albumínica e globulínica de sementes de jaca, a fração globulínica possui parte de suas proteínas com peso molecular superior ao das proteínas que constituem a fração albumínica (OLIVEIRA, 1980). A lectina, jacalina (BUNN-MORENO & CAMPOS NETO, 1981), foi purificada por cromatografia de afinidade de goma de guar imobilizada por "cross-linking" com epicloridrina (APPUKUTTAN et al., 1977; SURESHKUMAR et al., 1982; SILVA LIMA et al., 1986). Outro método usado para purificação da jacalina foi o da cromatografia de afinidade em IgA-Sepharose-4B (ROQUE-BARREIRA et al., 1986) e em agarose-D-Galactose (ROQUE-BARREIRA et al., 1987) que permitiu caracterização mais detalhada desta lectina, confirmando dados anteriores de MOREIRA & AINOZ (1981). Já foi também mostrado o efeito alergênico de proteínas de sementes de jaca em camundongos DBA 2 imunizados por via oral (RESTUM-MIGUEL & PROUVOST-DANON, 1985). Estudos preliminares da resposta imunológica de camundongos DBA 2 imunizados por via subcutânea com ovalbumina associada a jacalina mostraram que os níveis séricos de IgE anti-OVA eram estimulados pela jacalina, sugerindo assim, um efeito imunomodulador exercido por esta lectina sobre a síntese de IgE anti-ovalbumina (RESTUM-MIGUEL & PROUVOST-DANON, 1985). A jacalina se liga a IgA sérica e secretória, mas não a IgG ou IgM (ROQUE-BARREIRA & CAMPOS-NETO, 1985) propriedade esta usada para purificação da IgA do colostro humano (ROQUE-BARREIRA & CAMPOS-NETO, 1985) e

para quantificação desta classe de imunoglobulinas no colostro (ROQUE-BARREIRA & CAMPOS-NETO, 1984).

## 1.2 - Alérgenos

### 1.2.1 - Aspectos Moleculares

Há uma dificuldade suplementar para se estudar com precisão os efeitos provocados por alérgenos naturais complexos, em consequência do grande número de fatores não controlados rigidamente. Este fato tem levado investigadores a introduzir modificações nas moléculas de alérgenos, bem como sintetizar pequenos peptídios com propriedades alergênicas bem definidas, no intuito de caracterizar melhor os eventos bioquímicos da seqüência de reações que ocorrem durante a secreção de imunoglobulinas.

A maior parte do que se conhece hoje sobre a imunogenicidade e especificidade antigênica é resultante de estudos feitos com antígenos sintéticos (SELA, 1969). A relativa simplicidade destas moléculas facilita a interpretação dos resultados e, algumas vezes, permite detectar efeitos tais como variação genética da resposta imune, que não são facilmente observáveis quando se usa antígenos naturais complexos. Além disso, os antígenos sintéticos servem como modelo para se entender melhor outros fenômenos imunológicos, como: tolerância, competição antigênica e hipersensibilidade retardada (SELA, 1969). Portanto, com a utilização de moléculas antigênicas sintéticas, tem sido possível estudar vários parâmetros moleculares que influenciam na antigenicidade de uma substância, tais como o peso molecular, a configuração óptica e a conformação estérica.

O uso de proteínas com pesos moleculares diferentes tem mostrado que não há correlação direta entre o tamanho

da molécula e sua capacidade imunogênica. Um exemplo significativo é o do glucagon, que com peso molecular 3600, é dotado de boa atividade imunogênica. Contudo, é de aceitação geral que as moléculas de alto peso molecular têm mais chance de atuarem como antígenos pela possibilidade de possuírem determinantes antigênicos em maior número (UNANUE & BENECCERRAF, 1986).

A configuração óptica tem sido sempre invocada como elemento relevante na imunogenicidade de proteínas. Entretanto, os resultados obtidos quando a configuração é controlada, são controvertidos. Assim é que, experimentos realizados com isômeros D e L mostraram que os mesmos tinham comportamento imunogênico semelhante (SELA, 1969). Entretanto, os resultados obtidos pela imunização de camundongos e coelhos com polímeros constituídos exclusivamente de D-aminoácidos indicam que a imunogenicidade destes é fortemente dependente da dose (SELA, 1969). Assim, parece que a ineficiente formação de anticorpos contra polímeros de D-aminoácidos é devida a seu incompleto metabolismo (SELA, 1969).

A conformação nativa de uma proteína exerce um papel importante na determinação de sua especificidade antigênica, como é demonstrado pela ausência completa ou parcial de reações cruzadas entre proteínas desnaturadas e anticorpos induzidos pela mesma proteína em sua forma nativa. Este fato é indubitavelmente devido a mudanças que ocorrem na conformação da molécula protéica, resultando em perda dos determinantes antigênicos (SELA, 1969).

Com a finalidade de elucidar o papel da conformação do antígeno sobre a imunogenicidade e especificidade antigênica, tem sido investigada a resposta imune a polipeptídios sintéticos de seqüência e conformação conhecidas. Os resultados de imunização de coelhos com antígenos com determinantes antigênicos seqüenciais ou conformacionais foram semelhantes: ambos se apresentaram como bons imunógenos. Entretanto, parece que os anticorpos induzidos por proteínas na

tivas são formados principalmente contra os determinantes an tigênicos conformacionais (SELA, 1969).

### 1.2.2 - Alérgenos de Origem Vegetal

Os poucos conhecimentos que se tem atualmente sobre alérgenos originados de tecidos vegetais mostram que estas proteínas não são uniformemente distribuídas em todo o cor po da planta. Quando se toma em consideração os diferentes órgãos de uma mesma planta, pode-se ver que o conteúdo e as características de seus alérgenos podem variar segundo o te cido estudado. Assim, componentes das folhas e raízes de um vegetal podem não agir como alérgenos, mas componentes do pólen e das sementes, em quantidades mínimas, podem induzir intensas reações alérgicas (LAYTON et al., 1962). Além des tas, múltiplas investigações têm sido feitas no intuito de elucidar a natureza química dos alérgenos. A partir destes estudos ficou claro que os alérgenos são substâncias de al to peso molecular, não dialisáveis e freqüentemente identi ficados como proteínas (ENGELFRIED, 1940). Não obstante, es tudos mais recentes têm mostrado que os alérgenos podem ser também substâncias de baixo peso molecular. YOULE & HUANG (1978, 1979), estudando o papel fisiológico de proteínas de sementes de algodão e mamona mostraram que uma classe de proteínas 2S, de baixo peso molecular, solúveis em água e por isso consideradas como fazendo parte da fração albumíni ca, eram os alérgenos daquelas sementes que já haviam sido bem caracterizados por SPIES et al. (1951).

Praticamente, qualquer alimento tem a capacidade de induzir reações alérgicas. Entre os alimentos de origem ve getal, os que mais freqüentemente provocam tais reações são os grãos de cereais e de legumes (PERLMAN, 1980). Além dis so, os componentes alergênicos dos alimentos são múltiplos, complexos e constituem uma característica de cada vegetal.

A natureza versátil dos alérgenos tem, portanto, impulsionado numerosos investigadores a conduzir esforços no sentido de determinar o denominador comum da alergenicidade dos diversos alimentos de origem vegetal botanicamente interrelacionados. Sabe-se que alimentos de uma mesma origem botânica podem possuir alérgenos comuns, mas em quantidades diferentes nos diversos membros da família botânica, levando assim, a diferentes situações de reatividade imunológica. Considerando-se tal fato, são comuns as medidas preventivas de reações alérgicas alimentares, evitando-se alimentos de origem botânica próxima (PINESS et al., 1940). Além destas razões, os alérgenos ao serem empregados com objetivos nutricionais merecem atenção especial, particularmente, por não poderem ser considerados como proteínas tóxicas em si mesmas, uma vez que eles só afetam indivíduos predispostos a reagirem contra tais proteínas. Esta predisposição ou sensibilidade é uma característica do patrimônio genético do indivíduo e não inerente ao alérgeno, que para outros indivíduos pode ser uma proteína de alto valor nutritivo (PERLMANN, 1980).

### 1.2.3 - Alergoides

Além de estudos realizados com antígenos sintéticos, várias tentativas de modificações químicas de moléculas de alérgenos vêm sendo feitas, no intuito não só de caracterizar a alergenicidade dos mesmos, como com finalidade terapêutica, bloqueando a síntese de anticorpos anafiláticos (OVERELL, 1978). Entre os agentes que têm sido utilizados para induzir modificações na estrutura de alérgenos encontra-se o calor. Este método de desnaturação de proteínas, além de poder fornecer dados sobre o mecanismo da resposta imune, apresenta uma relevância particular, uma vez que muitos alimentos, que são potencialmente alergênicos após sofrerem o processo de cocção, são introduzidos rotineiramente na ali

mentação humana. Em estudos realizados por MALKIN & MARKOU (1938) não foi encontrada diferença, em 91% dos testes feitos, entre alimentos cozidos e crus. Experimentos mais recentes mostraram que não havia consistência na estabilidade de alérgenos vegetais quando medida através de testes de pele (PERLMAN, 1980). O mesmo autor observou também que para alguns alimentos a alergenicidade era perdida quando os mesmos eram aquecidos a 120°C por 20 minutos, enquanto que para outros havia pouca ou nenhuma alteração desta atividade. Estes resultados, bem como os de OVERELL (1978), foram obtidos usando-se a via digestiva para sensibilização. Por isso, embora não tenham sido satisfatórios, a antigenicidade de alérgenos modificados pelo calor continua sendo testada, utilizando-se outras vias de imunização.

Além do calor, têm sido utilizados reagentes químicos para tentar modificar a estrutura de alérgenos. Entre estes, o formaldeído foi um dos primeiros e, ainda, é um dos mais interessantes reagentes químicos usados para modificação de alérgenos. STULL et al. (1940) observaram que material alergênico tratado com formaldeído retinha, parcialmente, sua alergenicidade. Posteriormente NATERMAN (1957, 1965) usou formaldeído juntamente com outros reagentes para precipitação de alérgenos e verificou também que a alergenicidade era, pelo menos em parte, mantida. Tal resultado foi obtido quando eles observavam evidências clínicas em pacientes atópicos, os quais apresentavam reações sistêmicas. Em 1970, MARSH et al., por sua vez, mostraram que a incubação de alérgenos por 32 horas com formaldeído dava origem a alergóides (alérgenos modificados) cuja alergenicidade residual, em relação ao alérgeno nativo, era significativamente reduzida, mas era retida a capacidade de induzir síntese de anticorpos do tipo IgG que apresentavam, inclusive, reação cruzada com o alérgeno nativo. Além disso, avaliações clínicas preliminares de indivíduos não alérgicos mostraram que a IgE pode ser induzida com especificidade para o alergóide que, como a IgG, apresentava reação cruzada com o alérgeno nativo (MARSH, et al., 1972).

Em 1974, ISHIZAKA et al. mostraram que antígenos ao serem desnaturados com uréia 8 M ou terem suas cadeias polipeptídicas isoladas após dissociação do antígeno nativo perdiam a capacidade de reagir com IgG humana ou de coelho formada contra o antígeno nativo e nem apresentavam reação eritematosa em indivíduos sensíveis ao antígeno nativo. Continuando estes estudos, em 1975, ISHIZAKA et al. verificaram que embora este material desnaturado não tivesse os determinantes antigênicos da molécula nativa, ele tinha seus próprios determinantes imunogênicos capazes de estimular as células T específicas para o antígeno nativo e, através de um mecanismo de cooperação de linfócitos T sobre linfócitos B, aumentavam as respostas do tipos IgG e IgE em indivíduos sensíveis às moléculas antigênicas não desnaturadas.

Em 1977, PATTERSON et al. mostraram que misturas de alérgenos polimerizados com glutaraldeído apresentavam reação cruzada com a IgG formada contra o alérgeno nativo. Entretanto, a capacidade de induzir resposta de hipersensibilidade imediata mediada por IgE (alergenicidade) era substancialmente diminuída. Na FIGURA 1 tenta-se, esquematicamente, mostrar o mecanismo das reações mediadas por IgE, comparando-se o modo de ação de um antígeno não glutarizado (FIGURA 1A) com o de um antígeno glutarizado (FIGURA 1B). Como pode ser notado, quando o antígeno não está glutarizado ele se liga a todas as moléculas de IgE disponíveis na superfície celular. Por outro lado, quando a mesma quantidade de antígeno é apresentada sob a forma glutarizada, a diminuição da alergenicidade pode ser explicada por duas maneiras: uma, quando a mesma quantidade de antígeno é administrada existem poucas moléculas de polímeros, e portanto, reduzida oportunidade dos determinantes antigênicos se ligarem às moléculas de IgE, estabelecendo pontes entre elas, na superfície dos mastócitos; a outra é que, os determinantes antigênicos podem estar inacessíveis dentro de polímeros de alto peso molecular impedindo, igualmente, o estabelecimento de pontes entre as moléculas de IgE na superfície dos mastócitos (FIGURA 1B).

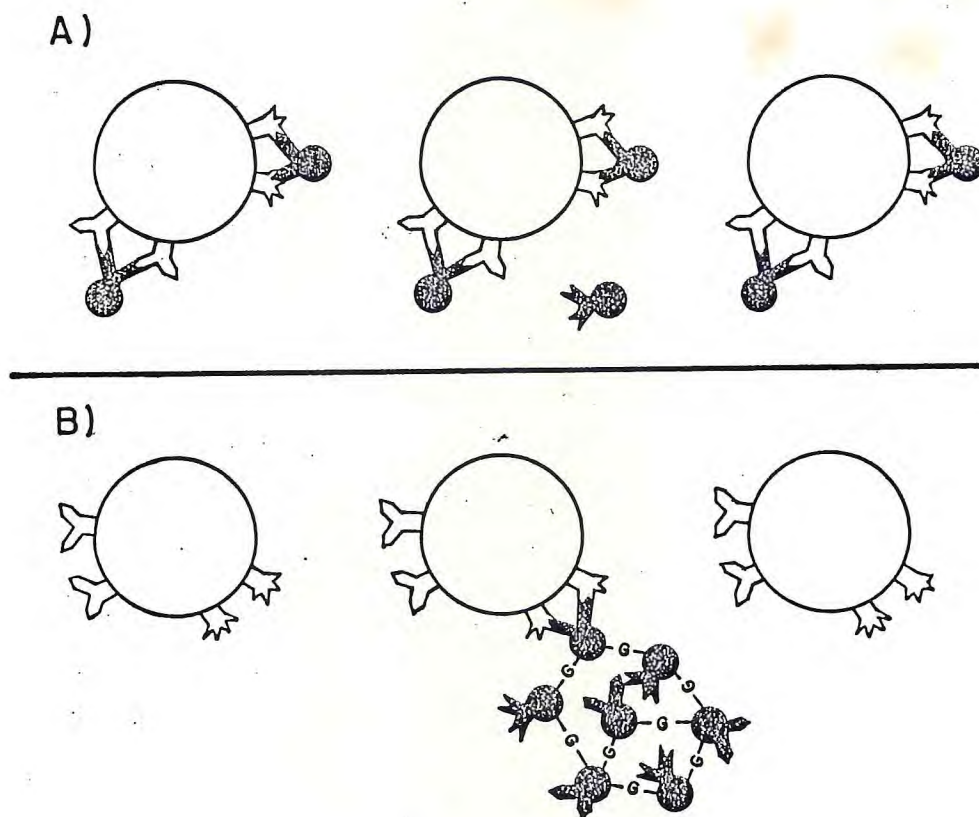


FIGURA 1 - Mecanismo da reação mediada por IgE. A) com antígeno não glutarizado; B) com antígeno glutarizado (PATTERSON et al., 1977).

### 1.3 - Lectinas - Relação com a Imunologia

No início de 1891, EHRLICH introduziu o uso de lec ti nas no estudo da imunologia. Sabe-se, contudo, que as pri me ir as referências sobre lectinas tinham sido feitas sobre a presença de atividade hemaglutinante em extratos de plan tas - ricina em mamona (*Ricinus communis*, 1888) e abrina em jequiriti (*Abrus precatorius*, 1891). Embora as preparações usadas por EHRLICH (1891), fossem muito grosseiras quando comparadas com os atuais critérios sobre lectinas, ele foi capaz de estabelecer alguns princípios fundamentais para a imunologia. Assim, ele mostrou que camundongos se tornavam imunes a uma dose letal de lectina por repetidas injeções subcutâneas com baixa dose da mesma. Posteriormente, ele observou que a imunização resultava na formação de proteí nas séricas específicas capazes de precipitar e neutralizar a lectina, e que havia uma relação entre a quantidade de an tis soro e a quantidade de lectina que era neutralizada. Além disso, ele mostrou que o soro contendo proteínas anti-rici na não protegia o animal contra abrina e vice-versa, ficando portanto, estabelecido o princípio da especificidade da res posta imune. EHRLICH (1891) demonstrou também que durante a gestação a imunidade às toxinas era transferida da mãe para o feto através do sangue e que, após o parto, ela podia ser transferida através do leite materno. Apesar destas e ou tras importantes descobertas, as lectinas atraíram pouca atenção até que, no início dos anos 60 esta atitude mudou drasticamente com a descoberta da atividade mitogênica da lectina de *Phaseolus vulgaris* (PHA) (NOWELL, 1960) e da aglu tinação preferencial de células malignas pela lectina do germe do trigo (WGA) (AUB et al., 1963, 1965; BURGER & GOLDBERG, 1967).

O emprego das lectinas no estudo dos fenômenos liga dos à resposta imune têm merecido particular atenção porque elas têm mostrado um comportamento versátil no tocante às

condições experimentais, ou seja, seu efeito pode ser dependente do tempo de inoculação, da dose e da espécie animal utilizada. Assim, foi mostrado que a lectina concanavalina A (Con A) suprimia a resposta humoral primária em camundongos (BARTH & SINGLA, 1973) e a aumentava em coelhos (ROMBALL & WEIGLE, 1975). Recentemente, foi demonstrado que PHA, um mitógeno de linfócitos T, induz modulação da síntese de IgE em camundongos, dependendo do tempo de inoculação (ASTORQUIZA & SAYAGO, 1984). De modo semelhante, a lectina, jacalina, de sementes de *Artocarpus integrifolia* L. foi descrita como um potente mitógeno de células T e ativador policlonal de linfócitos B independente de T para a secreção de imunoglobulinas (BUNN-MORENO & CAMPOS-NETO, 1981).

As lectinas são conhecidas por sua capacidade de se ligarem a carboidratos, abundantes na superfície celular, podendo tal ligação resultar em uma variedade de efeitos biológicos (TABELA 1). A hemaglutinação e a estimulação mitogênica são, dentre estes efeitos, os mais relevantes na aplicação das lectinas no estudo da imunologia.

TABELA 1 - Efeitos biológicos de lectinas (LIS & SHARON, 1986).

---



---

Aglutinação de eritrócitos e outros tipos de células
Estimulação mitogênica de linfócitos
Formação de células supressoras
Mediação de "killing of target cells" por linfócitos e macrófagos
Aumento da fagocitose de levedura e bactérias por macrófagos
Indução da formação de vacúolos em macrófagos
Efeitos imunossupressores "in vivo"
Indução da liberação de histamina por basófilos e mastócitos

---

A hemaglutinação é a mais facilmente detectável dentre as manifestações resultantes da interação de uma lectina com células, e por isso esta propriedade é muitas vezes usada para revelar a presença de lectinas em uma fonte biológica. A capacidade de aglutinar células distingue as lectinas de outras moléculas que se ligam também a açúcares, tais como as glicosidases e glicosiltransferases. Este fato está incluído na definição de lectinas de acordo com GOLDSTEIN et al. (1980).

O interesse pela atividade de aglutinação das lectinas foi fortemente estimulado nos anos 60, quando se observou acentuada diferença na aglutinabilidade entre células normais e malignas, embrionárias e adultas e entre células mitóticas e em interfase (LIS & SHARON, 1986).

A estimulação mitogênica é um dos efeitos mais relevantes da interação das lectinas com células. Em contraste com a estimulação por antígenos, em que clones específicos de linfócitos são induzidos a proliferar, as lectinas ativam múltiplos clones de linfócitos independente de sua especificidade antigênica. O fenômeno da estimulação policlonal pelas lectinas facilita enormemente o estudo e a detecção das mudanças associadas com a proliferação.

Essencialmente, todos os processos metabólicos examinados em linfócitos tratados com mitógenos estão estimulados, embora em diferentes graus e em diferentes tempos após a exposição da célula ao mitógeno. Além dos eventos comuns à maioria das células em crescimento ativo, linfócitos estimulados exibem certos aspectos únicos, tais como a liberação de uma variedade de polipeptídios biologicamente ativos, conhecidos como linfocinas, entre as quais a interleuquina-2 e o  $\gamma$ -interferon foram melhor caracterizados. Em torno de 72 a 96 horas após a estimulação, outras funções diferenciadas dos linfócitos ativados são detectadas, destacando-se entre estas, a produção de imunoglobulinas pelas células B e citotoxicidade de células T.

Embora exaustivamente estudado, o mecanismo da ação mitogênica de lectinas sobre os linfócitos ainda não está claro. Baseado em estudos com lectinas que inibem o metabolismo de linfócitos T e B humanos (Aglutinina de germe de trigo e a lectina de *Agaricus bisporus*) bem como com lectinas que estimulam as células T (PHA e Con A) foi proposto modelo para a organização da membrana dos linfócitos. De acordo com este modelo, a modulação positiva e negativa das funções dos linfócitos é exercida por discretos domínios de estimulação e inibição em sua superfície. Assim, as lectinas mitogênicas se ligariam aos receptores que estão associados aos domínios estimuladores, enquanto que, as lectinas não mitogênicas se ligariam aos receptores que estão dentro dos domínios inibidores (LIS & SHARON, 1986).

Um mecanismo mais detalhado da ação das lectinas nos linfócitos T-auxiliares foi recentemente proposto (FIGURA 2). Nesta FIGURA, a lectina bem como o antígeno agem nos linfócitos T-auxiliares fazendo-os passar de um estado de repouso, convencionalmente chamado de estágio  $G_0$ , ao estado ativo  $G_1$ . Tanto a lectina como o antígeno agiriam conjuntamente com a interleuquina-1 (IL-1) produzida pelos macrófagos. Admite-se que a influência da lectina mais a IL-1 ou do antígeno mais a IL-1 seria exercida na expressão dos receptores da interleuquina-2 (IL-2) (sinal 1) na superfície da membrana dos linfócitos T-auxiliares que passariam a produzir a IL-2 (sinal 2), levando, então à síntese de DNA e consequente proliferação celular (FIGURA 2) (KLAUS & HAWRYLOWICZ, 1984). Este ciclo de ativação pode ser interrompido em  $G_1$  caso o estímulo provocado pela lectina ou pelo antígeno (sinal 1) não seja suficiente para a produção de IL-2 (sinal 2).

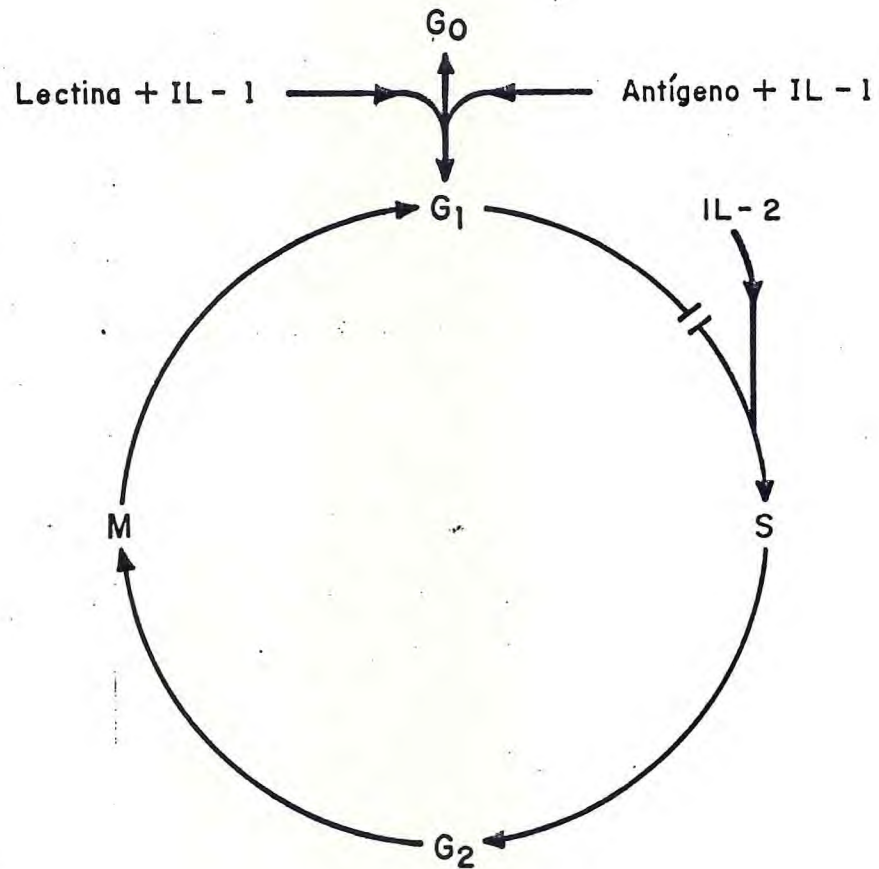


FIGURA 2 - Controle do ciclo das células T.  $G_0$ : estado de repouso;  $G_1 \rightarrow S$ : síntese de DNA;  $G_2 \rightarrow M$ : mitose (KLAUS & HAWRYLOWICZ, 1984).

## 1.4 - Resposta Imunológica

### 1.4.1 - Considerações Gerais

A resposta imunológica é um mecanismo de profilaxia, que leva os animais a produzirem anticorpos e células reativas em resposta a uma grande variedade de moléculas e macromoléculas orgânicas, principalmente proteínas. A resposta imunológica ocorre praticamente em todas as espécies de mamíferos testados bem como no homem. Ela é de grande importância para a sobrevivência, constituindo o principal meio de defesa contra agentes infecciosos, como também outros agentes: pólenes, hemácias, drogas e, inclusive, constituintes do próprio organismo nos processos de auto-imunidade. A resposta imune pode ser mediada por células (imunidade celular), em que o antígeno interage especificamente com linfócitos reativos e também mediada através de moléculas de anticorpos (imunidade humoral), os quais são amplamente difusíveis na circulação sanguínea bem como em outros fluídos do organismo.

### 1.4.2 - Reações de Hipersensibilidade

Muito tempo após a descoberta das antitoxinas e dos anticorpos antimicrobianos, a resposta imunológica foi considerada apenas como de caráter exclusivamente protetor. Somente em 1902, PORTIER & RICHET mostraram que as respostas imunológicas também eram capazes de causar danos como a morte de cães, por exemplo, que haviam sido inoculados previamente com determinadas substâncias. O termo hipersensibilidade tornou-se, de modo corrente, usado como sinônimo do estado alterado induzido por um antígeno em que as reações

patológicas podem ser subseqüentemente desencadeadas pelo mesmo antígeno ou por uma substância estruturalmente a ele semelhante.

As reações de hipersensibilidade foram definidas por GELL & COOMBS (1968) em quatro tipos principais, aos quais se pode acrescentar um quinto, o estimulatório, proposto por ROIT (1983). As reações dos tipos I, II, III e V dependem da interação do antígeno com anticorpos e são chamadas reações do tipo imediato. A reação do tipo IV envolve receptores ligados à superfície dos linfócitos e foi denominada reação de hipersensibilidade retardada ou celular. Esta classificação foi proposta com base nos mecanismos de cada reação. A reação do tipo I, chamada hipersensibilidade anafilática ou anafilaxia será considerada a seguir.

#### 1.4.3 - Anafilaxia

Anafilaxia, termo cunhado por RICHET (1902) (do grego ana = contra e phylaxis = proteção), é um estado alterado da resposta imunológica, sendo caracterizado por um aumento da susceptibilidade do animal à reinoculação de um antígeno, podendo conduzir a estados patológicos e/ou à morte. O processo de anafilaxia manifesta-se após a administração de um antígeno a um animal com anticorpos anafiláticos para o antígeno em questão. Este processo é provocado pela liberação de aminas vasoativas, quando da extrusão dos grânulos dos mastócitos e basófilos em resposta à formação dos complexos antígeno-anticorpo (FIGURA 3). Estas substâncias, histamina e serotonina, preexistem nas células e são liberadas quando da formação dos complexos, provocando uma vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. As manifestações da anafilaxia podem ser sistêmicas, levando a um estado de choque, asfixia e até à morte, podendo também ocorrer uma resposta restrita no local da injeção (anafilaxia cutânea),

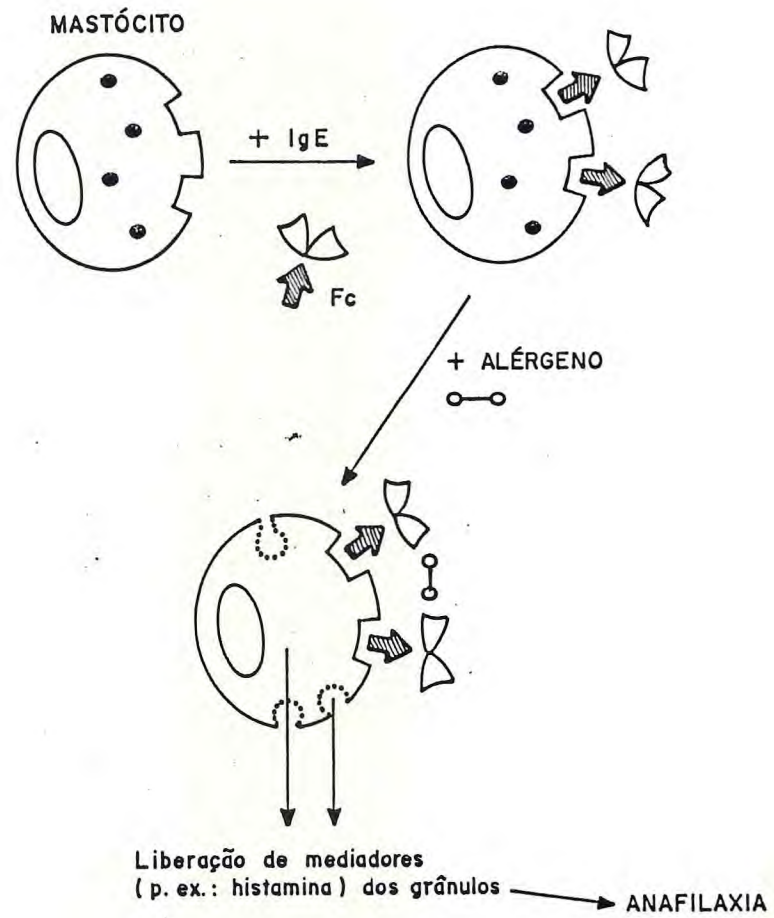


FIGURA 3 - Reação de hipersensibilidade anafilática. Degranulação do mastócito após interação do antígeno com os anticorpos homocitotrópicos fixados (ROIT, 1983).

caracterizada por eritema e edema. Os fenômenos da anafilaxia, sistêmica ou localizada, ocorrem não apenas em animais ativamente sensibilizados (anafilaxia ativa), mas podem ser passivamente transferidos pela administração de um antígeno oriundo de organismos sensibilizados (anafilaxia passiva). A anafilaxia ativa requer um intervalo de tempo, entre a primeira e a segunda injeção do antígeno, de uma a duas semanas, tempo necessário para a formação de anticorpos, enquanto que a anafilaxia passiva requer um período de latência que se limita a algumas horas e corresponde ao tempo necessário para a difusão dos anticorpos no interior dos tecidos e à sua fixação aos mesmos. As reações anafiláticas locais, particularmente na pele, têm sido muito úteis no estudo dos fenômenos anafiláticos, através da aplicação de soro de animais sensibilizados na pele de animais não sensibilizados, o que resulta na sensibilização passiva local, no sítio da injeção. O desencadeamento do processo de anafilaxia cutânea passiva (PCA), com o antígeno associado a um corante, no caso azul de Evans, resultará em uma inflamação aguda, caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, vermelhidão e extravasamento de proteínas do sangue, formando assim uma mancha visível na pele, no local da inoculação. Esta técnica foi descrita por OVARY (1952) e é ainda bastante empregada.

#### 1.4.4 - Modulação da Síntese de Anticorpos Anafiláticos

Há geralmente duas classes de anticorpos que são responsáveis pelo desencadeamento das reações anafiláticas na maioria dos mamíferos: as imunoglobulinas da classe E e uma subclasse de IgG (IgG<sub>1</sub>) (PROUVOST-DANON *et al.*, 1972). Estes anticorpos anafiláticos têm sido amplamente estudados (PROUVOST-DANON *et al.*, 1975; BINAGHI & PERRUDET-BADOUX, 1977; LEHRER, 1977) e são denominados anticorpos homocito

trópicos, embora a IgE de camundongos se fixe em mastócitos de ratos.

A síntese de anticorpos anafiláticos é modulada por vários fatores, entre estes as características genéticas do animal experimental e a dose do agente sensibilizante. Assim, em estudos de seleção genética, foi demonstrada a existência de linhagens de camundongos "bons" respondedores e "maus" respondedores, no que diz respeito ao nível de produção de anticorpos (BIOZZI et al., 1977). Por outro lado, observou-se também que as altas doses do antígeno induziam uma resposta do tipo IgE baixa e transtitoria, mas uma resposta do tipo IgG com elevados valores (VAZ & LEVINE, 1970; VAZ et al., 1970; PROUVOST-DANON et al., 1977). Além disso, tem sido demonstrada a existência de subpopulações de linfócitos T, com funções "helper" e supressora, que regulam a síntese de IgE. Estas células T, específicas para as IgEs, parecem ser distintas daquelas que regulam a produção de IgG (KISHIMOTO, 1982).

### 1.5 - Objetivo

O presente trabalho é um estudo da resposta imunológica do tipo IgG e IgE induzida em camundongos imunizados por via subcutânea com diferentes frações proteicas de sementes de *Artocarpus integrifolia* L. A presença da lectina, jacalina, nos extratos proteicos será avaliada no tocante a seu papel imunomodulador.

## 2 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 - Animais

Camundongos "Swiss" com idades entre 8 e 10 semanas, de ambos os sexos, trazidos do Connaught Laboratories Limited (Ontário-Canadá) para os Laboratórios Alfa-Connlab do Brasil S.A. (Fortaleza-Ceará) e mantidos em pequena colônia no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC-Fortaleza - Ceará).

Ratos albinos, adultos, machos, pesando entre 300 e 400 g e mantidos em colônia fechada no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC - Fortaleza - Ceará).

### 2.2 - Antígenos de Origem Vegetal

Foram utilizados como antígenos as seguintes preparações protéicas extraídas de sementes de *Artocarpus integrifolia* L. (jaca, variedade mole) obtidos do mercado local:

- FRAÇÃO GLOBULÍNICA TOTAL (GT) preparada segundo OLIVEIRA (1980), usando-se, porém NaCl 0,15 M para a extração das proteínas solúveis nestas condições;

- FRAÇÃO GLOBULÍNICA SEM LECTINA (GSL) obtida quando da purificação da lectina em coluna de afinidade de goma de guar imobilizada por "cross-linking" com epicloridrina segundo SILVA LIMA et al. (1986), como descrito posteriormente;

- FRAÇÃO GLOBULÍNICA PROCESSADA (GP) extraída de sementes previamente submetidas à cocção. Aproximadamente

400 g de sementes secas foram cozidas por 2 horas a 100°C em 2 litros de água. A seguir, as sementes foram secas em estufa a 80°C durante 22 horas e a fração GP preparada segundo OLIVEIRA (1980);

- FRAÇÃO ALBUMÍNICA TOTAL (AT) obtida segundo OLIVEIRA (1980), usando-se, porém, NaCl 0,15M para a extração das proteínas solúveis nestas condições;

- FRAÇÃO ALBUMÍNICA SEM LECTINA (ASL) obtida quando da purificação da lectina em coluna de afinidade de goma de guar imobilizada por "cross-linking" com epicloridrina segundo SILVA LIMA et al. (1986), como descrito posteriormente;

- FRAÇÃO ALBUMÍNICA PROCESSADA (AP) extraída de sementes previamente submetidas ao mesmo processo de cocção descrito para a fração GP e obtida segundo OLIVEIRA (1980);

- FRAÇÃO LECTÍNICA PURIFICADA (LP) obtida das frações albumínica e globulínica de acordo com a metodologia descrita por SILVA LIMA et al. (1986). A lectina (jacalina) foi purificada por cromatografia de afinidade de goma de guar imobilizada por "cross-linking" com epicloridrina segundo APPUKUTTAN et al. (1977) e SURESHKUMAR et al. (1982). Uma coluna de goma de guar medindo 20,0 x 2,2 cm foi equilibrada com Tris 0,05 M - Ácido acético 0,025 M, NaCl 0,1 M, pH 8,0 e a ela foi aplicada uma solução da fração albumínica total ou da fração globulínica total. As proteínas que não se ligaram à coluna foram eluídas com este tampão e a seguir a jacalina foi eluída com o mesmo tampão contendo glicose 0,1 M.

### 2.3 - Teste de Hemaglutinação

A atividade hemaglutinante das frações protéicas foi determinada utilizando o método descrito por MOREIRA & PERONE (1977) modificado para o uso de hemácias de coelho a

2% em NaCl 0,15 M e em presença de  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mn}^{+2}$  (MOREIRA et al., 1983). No presente trabalho foram usadas hemácias de camundongos "Swiss".

#### 2.4 - Adjuvante

Foi usado como adjuvante o gel de hidróxido de alumínio ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ), devido seu forte poder de adsorção de proteínas e por representar o melhor adjuvante para uma resposta imunológica do tipo IgE (PROUVOST-DANON et al., 1966). Sua preparação foi a seguinte: 15 g de sulfato de amônio e alumínio ( $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) foram dissolvidos em 180 ml de água destilada, sendo em seguida acrescentados 75 ml de NaOH 1 N, gota a gota. A solução foi deixada em repouso por cerca de 24 horas, formando-se então um precipitado de  $\text{Al}(\text{OH})_3$ . O precipitado foi lavado com água destilada por cinco (5) vezes, seguido por centrifugação (Centrífuga SORVAL RC-5, ROTOR GSA) a 2.000 x g durante vinte (20) minutos. Após a última lavagem o precipitado foi ressuspenso em um volume de aproximadamente 15 ml de água destilada a fim de se obter um gel espesso, porém pipetável, tendo-se o cuidado de fazer uma boa homogeneização para evitar formação de grumos.

Da suspensão foram tomadas alíquotas de 1 ml, colocadas em estufa a 100°C durante 24 horas e determinado o peso seco. O gel foi ajustado para uma concentração de 50 a 60 mg/ml com NaCl 0,15 M. O adjuvante assim preparado foi adicionado às suspensões antigênicas, imediatamente antes das mesmas serem injetadas nos camundongos.

#### 2.5 - Reagentes

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

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

Goma de guar - lote 114F - 0742 de Sigma Chemical Co., St Louis, USA.

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

Os demais reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

## 2.6 - Imunização por Via Subcutânea

Grupos de dez (10) camundongos "Swiss" foram subcutaneamente injetados no dorso com 0,5 ml de solução salina esterilizada contendo diferentes doses dos antígenos e 10 mg do adjuvante (gel de hidróxido de alumínio). Nos 21º e 35º dias após a imunização inicial, foram aplicados reforços com as mesmas quantidades dos diferentes antígenos usados na imunização inicial, porém sem adjuvante.

## 2.7 - Obtenção de Antissoros

As amostras de sangue foram coletadas com pipetas Pasteur, em diferentes dias (0, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 após a imunização inicial) por punção no plexo retro-orbital dos camundongos. O "pool" de sangue foi deixado em repouso durante uma hora em estufa a 37°C para melhor retração do coágulo. Recolhido o "pool" de soro, este foi centrifugado (International Clinical Centrifuge modelo CL 4487x-7) a 2.500 r.p.m. por cinco (5) minutos para obtenção de um soro limpo. Em seguida, o soro foi distribuído em tubos de plástico em volume de 0,2 a 1,0 ml e armazenado a -20°C.

## 2.8 - Anafilaxia Cutânea Passiva

A quantificação de anticorpos do tipo IgE em soro de camundongos foi feita através de reações de anafilaxia cutânea passiva (PCA) por sua capacidade de sensibilizar pele de rato após um período de latência de 18 horas (OVARY, 1952; MOTA & WONG, 1959). Por outro lado, a quantificação de anticorpos do tipo IgG em soro de camundongos foi feita também através de reações de PCA, porém, por sua capacidade de sensibilizar pele de camundongo após um período de latência de 2 horas.

Os resultados foram expressos em títulos de PCA, que correspondem ao logaritmo na base dois do inverso da diluição máxima do antissoro (Dmax), capaz de provocar uma reação cutânea positiva, ou seja:

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

### 2.8.1 - Reações de Anafilaxia Cutânea Passiva para IgG em Camundongos

Títulos de anticorpos do tipo IgG em "pools" de soros de camundongos foram determinados por reações de PCA em camundongos "Swiss". A pele da região dorsal dos animais foi raspada e os antissoros em diluições seriadas foram injetados intradermicamente, em volumes de 50  $\mu$ l, em pontos previamente marcados. Após um período de latência de 2 horas, as reações de PCA foram detectadas por desencadeamento intravenoso (plexo retro-orbital) com soluções salinas (0,25 ml, 0,5%) de azul de Evans contendo os seguintes antígenos: fração globulínica total (GT) 100  $\mu$ g, fração globulínica sem lectina (GSL) 250  $\mu$ g, fração globulínica sem lectina (GSL) 200  $\mu$ g + fração lectínica purificada (LP) 50  $\mu$ g, fração globulínica processada (GP) 250  $\mu$ g, fração albumínica

total (AT) 100  $\mu$ g, fração albumínica sem lectina (ASL) 250  $\mu$ g e fração albumínica processada (AP) 250  $\mu$ g. Trinta minutos mais tarde, os camundongos foram sacrificados em câmara fechada em presença de éter e a pele foi dissecada para a leitura da reação, feita através de manchas azuladas provocadas pelo extravasamento do corante nos locais das aplicações dos antissoros nas diversas diluições. Controles sem antissoro (salina) ou antígeno nas soluções desencadeantes deram resultados negativos. Cada teste foi feito, pelo menos, em quatro (4) camundongos. Em todos os testes de PCA, para uma avaliação quantitativa precisa dos títulos dos soros, foram injetados soros de títulos conhecidos, contendo anticorpos do tipo IgG, e os resultados foram usados para corrigir os títulos do soro experimental.

#### 2.8.2 - Reações de Anafilaxia Cutânea Passiva para IgE em Ratos

Títulos de anticorpos do tipo IgE em soro de camundongos foram determinados por reações de PCA em ratos albinos. A pele da região dorsal dos animais foi raspada e, diluições seriadas dos antissoros foram injetadas intradermicamente, em volumes de 100  $\mu$ l, em pontos previamente marcados. Após um período de latência de 18 horas, para sensibilização da pele, as reações de PCA foram desencadeadas por via endovenosa, na veia peniana, com soluções salina (1,0 ml, 0,5%) de azul de Evans contendo os seguintes antígenos: fração globulínica total (GT) 500  $\mu$ g, fração globulínica sem lectina (GSL) 1,5 mg, fração globulínica sem lectina (GSL) 1,5 mg + fração lectínica purificada (LP) 250  $\mu$ g, fração globulínica processada (GP) 1,5 mg, fração albumínica sem lectina (ASL) 1,5 mg, fração albumínica sem lectina (ASL) 1,5 mg + fração lectínica purificada (LP) 250  $\mu$ g e fração albumínica processada (AP) 1,5 mg. Após trinta (30) minutos, os ratos foram sacrificados em câmara fechada em presença de éter e a pele foi dissecada para a leitura da reação, feita através de manchas

azuladas provocadas pelo extravasamento do corante nos locais das aplicações dos antissoros nas diversas diluições. Controles sem antissoro (salina) ou antígeno nas soluções desencadeantes deram resultados negativos. Cada teste foi feito, pelo menos, em dois (2) ratos. Em todos os testes de PCA, para uma avaliação quantitativa precisa do título do soro, foram incluídos soros de títulos conhecidos, contendo anticorpos do tipo IgE, e os resultados foram usados para corrigir os títulos do soro experimental.

## 2.9 - Esquema Experimental

Os camundongos foram divididos em grupos de dez (10) animais e imunizados por via subcutânea com diferentes doses das frações protéicas (antígenos) de acordo com o seguinte esquema:

- A - Grupo controle de animais não imunizados
- B - Grupo controle de camundongos imunizados com 1, 10 e 100  $\mu$ g de ovalbumina
- C - Grupo da fração globulínica total (GT)
  - C.1 - Camundongos imunizados com 1  $\mu$ g
  - C.2 - Camundongos imunizados com 10  $\mu$ g
  - C.3 - Camundongos imunizados com 100  $\mu$ g
- D - Grupo da fração globulínica sem lectina (ASL)
  - D.1 - Camundongos imunizados com 10  $\mu$ g
  - D.2 - Camundongos imunizados com 100  $\mu$ g
- E - Grupo de camundongos imunizados com 100  $\mu$ g da fração globulínica processada (GP)
- F - Grupo da fração albumínica total (AT)
  - F.1 - Camundongos imunizados com 1  $\mu$ g
  - F.2 - Camundongos imunizados com 10  $\mu$ g

- F.3 - Camundongos imunizados com 100  $\mu$ g
- G - Grupo da fração albumínica sem lectina (ASL)
  - G.1 - Camundongos imunizados com 10  $\mu$ g
  - G.2 - Camundongos imunizados com 100  $\mu$ g
- H - Grupo de camundongos imunizados com 100  $\mu$ g da fração albumínica processada (AP)
- I - Grupo de camundongos imunizados com 100  $\mu$ g de ovalbumina em ausência e presença de diferentes doses da fração lectínica purificada (LP)
  - I.1 - Camundongos imunizados com 100  $\mu$ g de OVA
  - I.2 - Camundongos imunizados com 100  $\mu$ g de OVA + 5  $\mu$ g da fração LP
  - I.3 - Camundongos imunizados com 100  $\mu$ g de OVA + 50  $\mu$ g da fração LP.

### 3 - RESULTADOS

3.1 - Na TABELA 2 estão discriminadas as atividades hema-  
glutinantes das várias frações protéicas de *Artocar-  
pus integrifolia* L. expressas em atividades específi-  
cas.

TABELA 2 - Atividades específicas das diferentes frações pro-  
téicas de sementes de *Artocarpus integrifolia* L.

Frações protéicas	Atividades específicas (unidade/mg*)
Fração albumínica processada	0
Fração albumínica sem lectina	0
Fração albumínica total	1440
Fração globulínica processada	0
Fração globulínica sem lectina	0
Fração globulínica total	740
Fração lectínica purificada	1500

(\*) Unidade de hemaglutinação (U.H.)

### 3.2 - Respostas dos Tipos IgG e IgE em Camundongos Imunizados por Via Subcutânea com Ovalbumina (OVA)

Os títulos de PCA para as respostas dos tipos IgG e IgE obtidos pela imunização subcutânea de camundongos com 1, 10 e 100  $\mu\text{g}$  de OVA, são mostrados nas FIGURAS 4 e 5 respectivamente. As reações de PCA foram desencadeadas com OVA.

#### 3.2.1 - Resposta do Tipo IgG

Para os camundongos imunizados com 1  $\mu\text{g}$  de OVA (FIGURA 4A), as reações de PCA revelaram síntese de IgG durante a resposta primária (7, 14 e 21 dias após a imunização inicial). Observou-se um título de 1 com 7 e 14 dias, que se elevou a 2 com 21 dias, a 4 com 28 dias (7 dias após a aplicação do primeiro reforço), aumentou para 6 com 35 dias e atingiu valor 7 aos 42 dias (7 dias após a aplicação do segundo reforço). Em soro de camundongos imunizados com 10  $\mu\text{g}$  de OVA (FIGURA 4B), foi detectada síntese de IgG com 7 dias, com título de 2, que caiu para 1 aos 14 dias e elevou-se novamente a 2 com 21 dias. Aos 28 dias observou-se um título de 5, que se elevou para 7 com 35 dias e manteve-se inalterado até o final do experimento. Para os animais sensibilizados com 100  $\mu\text{g}$  de OVA (FIGURA 4C), as reações de PCA revelaram título zero aos 7 dias, passando a 2 aos 14 dias, elevando-se a 3 com 21 dias, atingindo valor 8 aos 28 dias e mantendo-se inalterado até o 42º dia após a imunização inicial.

Estes dados estão de acordo com a forma clássica de síntese de IgG onde os níveis séricos destes anticorpos aumentam com a elevação da dose e com os reforços do agente sensibilizante.

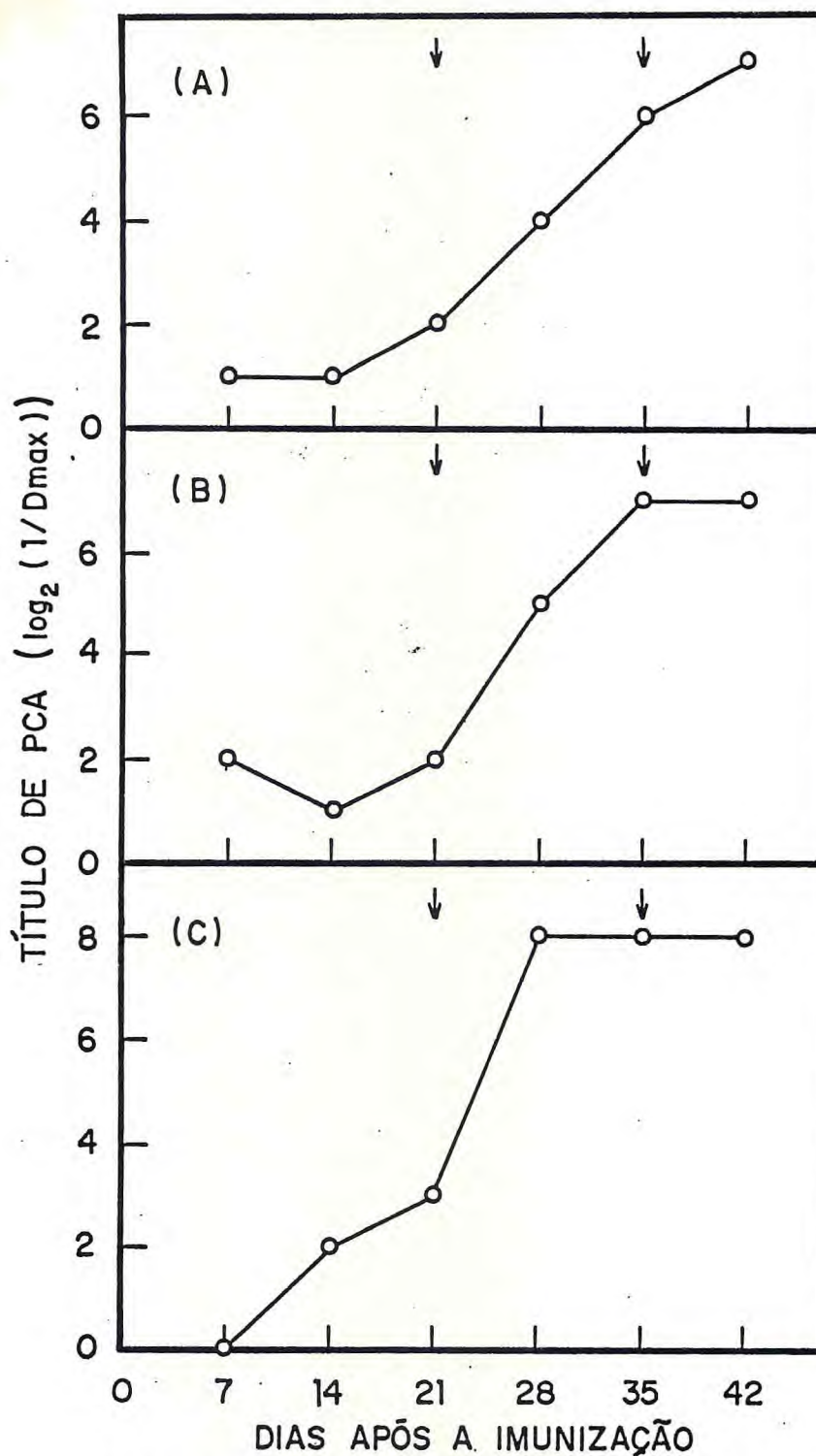


FIGURA 4 - Resposta do tipo IgG em camundongos imunizados por via subcutânea com 1 (A), 10 (B) e 100  $\mu\text{g}$  (C) de ovalbumina. As reações de PCA foram desencadeadas em camundongos, após um período de latência de 2 horas, com 250  $\mu\text{g}$  de ovalbumina. As setas indicam os dias de aplicação dos reforços.

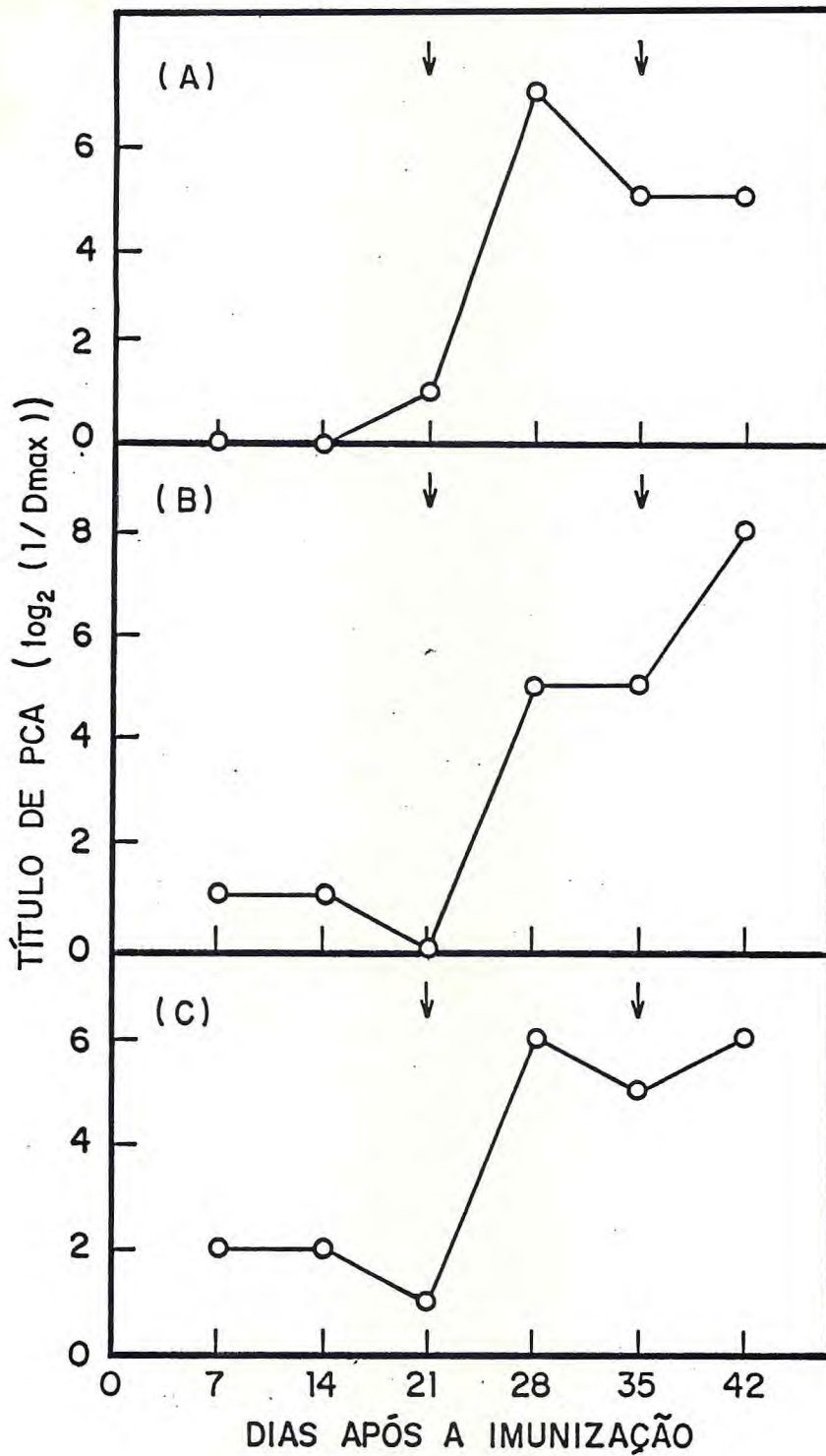


FIGURA 5 - Resposta do tipo IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 1 (A), 10 (B) e 100 µg (C) de ovalbumina. As reações de PCA foram desencadeadas em ratos, após um período de latência de 18 horas, com 1,5 mg de ovalbumina. As setas indicam os dias de aplicação dos reforços.

### 3.2.2 - Resposta do Tipo IgE

Em soro de animais sensibilizados com 1  $\mu$ g de OVA (FIGURA 5A), não foi detectada síntese de IgE aos 7 e 14 dias após a imunização inicial. Os resultados apresentaram título de PCA com valor 1 no 21º dia, que se elevou a 7 no 28º dia, caiu para 5 aos 35 dias e manteve-se constante até o 42º dia após a imunização inicial. Para os camundongos imunizados com 10  $\mu$ g de OVA (FIGURA 5B), as reações de PCA revelaram síntese de IgE com 7 e 14 dias com título de PCA igual a 1, que caiu a zero com 21 dias, elevou-se a 5 no 28º dia e alcançou valor 8 aos 42 dias (7 dias após a aplicação do segundo reforço). Para os animais sensibilizados com 100  $\mu$ g de OVA (FIGURA 5C), foi detectada síntese de IgE com título de PCA 2 aos 7 e 14 dias, que caiu para 1 com 21 dias, elevou-se a 6 no 28º dia, caiu para 5 com 35 dias e alcançou novamente o valor 6 aos 42 dias após a imunização inicial.

Estes resultados mostram que somente com dose sensibilizante de 100  $\mu$ g de OVA, os níveis séricos de IgE foram comparáveis aos padrões clássicos, em que a síntese destes anticorpos aumenta com uma dose de reforço, cai em seguida e aumenta novamente com outra dose de reforço.

A imunização com ovalbumina foi feita para se avaliar a reatividade imunológica dos animais usados neste trabalho.

### 3.3 - Respostas dos Tipos IgG e IgE em Camundongos Imunizados por Via Subcutânea com a Fração Albumínica Total (AT)

Os títulos de PCA para as respostas dos tipos IgG e IgE obtidos pela imunização de camundongos por via subcutânea com 1, 10 e 100  $\mu$ g da fração AT, são mostrados nas FIGU

RAS 6 e 7 respectivamente. As reações de PCA para IgG foram desencadeadas com as frações AT e ASL e para IgE foram de desencadeadas com as frações ASL e ASL + LP.

### 3.3.1 - Resposta do Tipo IgG

Para os camundongos imunizados com 1  $\mu$ g da fração AT (FIGURA 6A), as reações de PCA desencadeadas com o antígeno específico (fração AT) ou com a fração ASL não revelaram síntese de IgG ao longo de todo o experimento. Para os animais sensibilizados com 10  $\mu$ g da fração AT (FIGURA 6B), as reações de PCA desencadeadas com o antígeno específico (fração AT) não detectaram síntese de IgG durante a resposta primária. Os resultados apresentaram um título de 2 com 28 dias, que se elevou a 4 com 35 dias e atingiu valor 5 aos 42 dias após a imunização inicial. As reações de PCA para estes mesmos soros, desencadeadas com a fração ASL, igualmente àquelas reações desencadeadas com a fração AT, não mostraram síntese de IgG aos 7, 14 e 21 dias após a imunização inicial. Um título de 3 foi revelado com 28 dias, que se manteve inalterado aos 35 e 42 dias. Para os camundongos imunizados com 100  $\mu$ g da fração AT (FIGURA 6C), as reações de PCA desencadeadas com a fração AT não revelaram síntese de IgG durante a resposta primária. Um título de 4 foi detectado com 28 dias, que aumentou para 6 no 35º dia e manteve-se inalterado até o final do experimento. Já as reações de PCA realizadas com estes mesmos soros e desencadeadas com a fração ASL revelaram síntese de IgG durante a resposta primária, aos 14 e 21 dias, com título de PCA igual a 1, que se elevou a 3 nos 28º e 35º dias e alcançou valor de 4 no 42º dia após a imunização inicial.

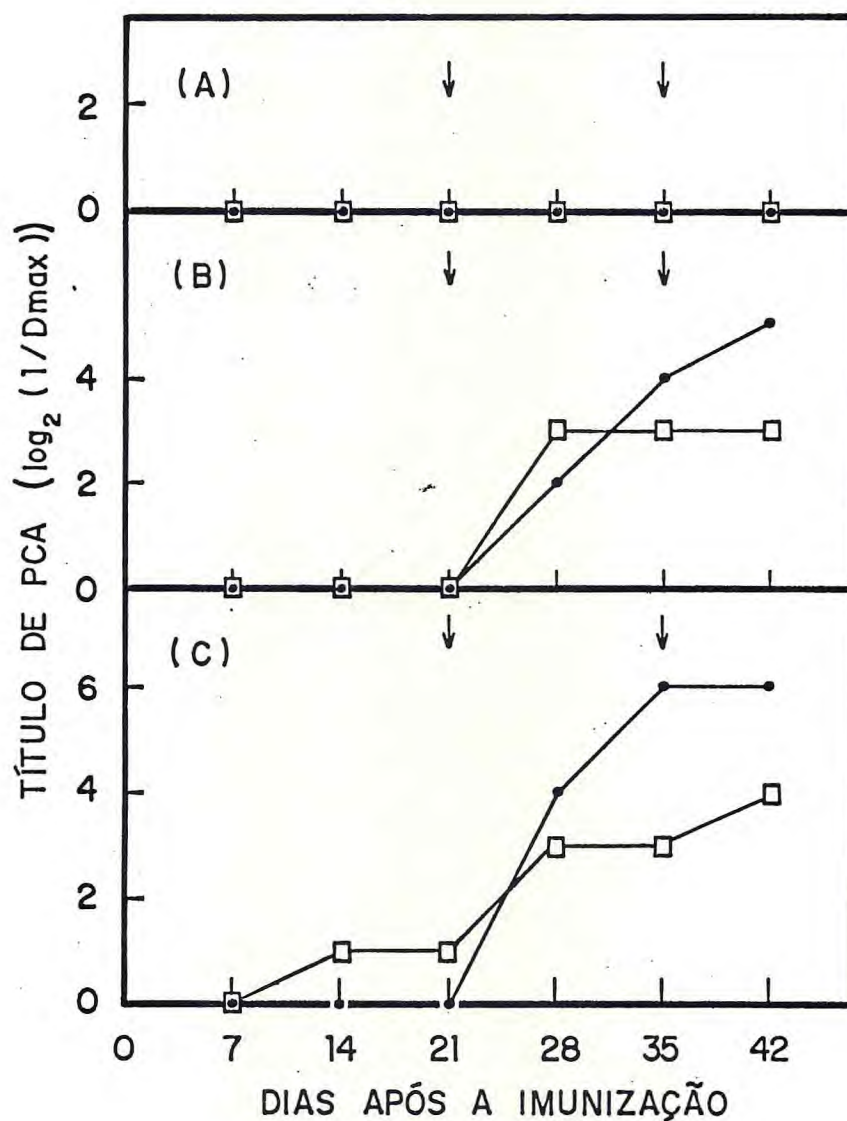


FIGURA 6 - Resposta do tipo IgG em camundongos imunizados por via subcutânea com 1 (A), 10 (B) e 100 µg (C) da fração AT. As reações de PCA foram desencadeadas em camundongos, após um período de latência de 2 horas, com 100 µg de AT (●—●), 250 µg de ASL (□—□). As setas indicam os dias de aplicação dos reforços.

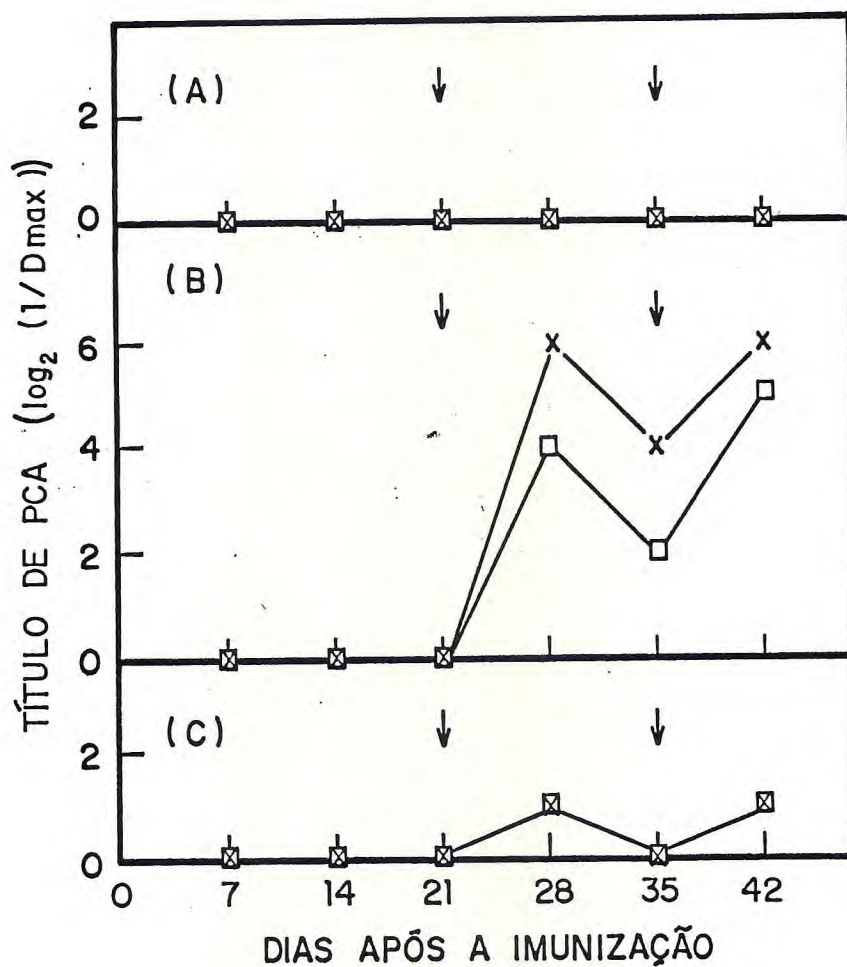


FIGURA 7 - Resposta do tipo IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 1 (A), 10 (B) e 100 µg (C) da fração AT. As reações de PCA foram desencadeadas em ratos, após um período de latência de 18 horas, com 1,5 mg de ASL (□—□), 1,5 mg de ASL + 250 µg de LP (x—x). As setas indicam os dias de aplicação dos reforços.

### 3.3.2 - Resposta do Tipo IgE

Para os camundongos imunizados com 1  $\mu$ g da fração AT (FIGURA 7A), as reações de PCA desencadeadas com as frações ASL e ASL + LP apresentaram títulos nulos tanto na resposta primária como na resposta secundária. Em soro de animais sensibilizados com 10  $\mu$ g da fração AT (FIGURA 7B), não foi detectada síntese de IgE durante a resposta primária, quando as reações de PCA foram desencadeadas com as frações ASL e ASL + LP. No decurso da resposta secundária, observou-se um título de 4 com 28 dias, que caiu para 2 com 35 dias e elevou-se para 5 aos 42 dias, quando as reações de PCA foram desencadeadas com a fração ASL. Já com a fração ASL + LP, detectou-se um título de 6 aos 28 dias, que caiu para 4 aos 35 dias e atingiu novamente o valor 6 no 42º dia. Para os camundongos imunizados com 100  $\mu$ g da fração AT (FIGURA 7C), só foi detectada síntese de IgE a partir do 28º dia, quando se observou título de PCA igual a 1, que caiu a zero no 35º dia e elevou-se novamente a 1 aos 42 dias, quando as reações de PCA foram desencadeadas tanto com a fração ASL quanto com a fração ASL + LP.

A fração AT não pôde ser utilizada como antígeno desencadeante das reações de PCA para a resposta do tipo IgE porque as doses usadas eram superiores à dose letal.

### 3.4 - Resposta dos Tipos IgG e IgE em Camundongos Imunizados por Via Subcutânea com a Fração Albumínica Sem Lectina (ASL)

Os títulos de PCA para as respostas dos tipos IgG e IgE obtidos pela imunização de camundongos por via subcutânea com 10 e 100  $\mu$ g da fração ASL, são mostrados nas FIGURAS 8 e 9 respectivamente. As reações de PCA foram desencadeadas com as frações ASL e AP.

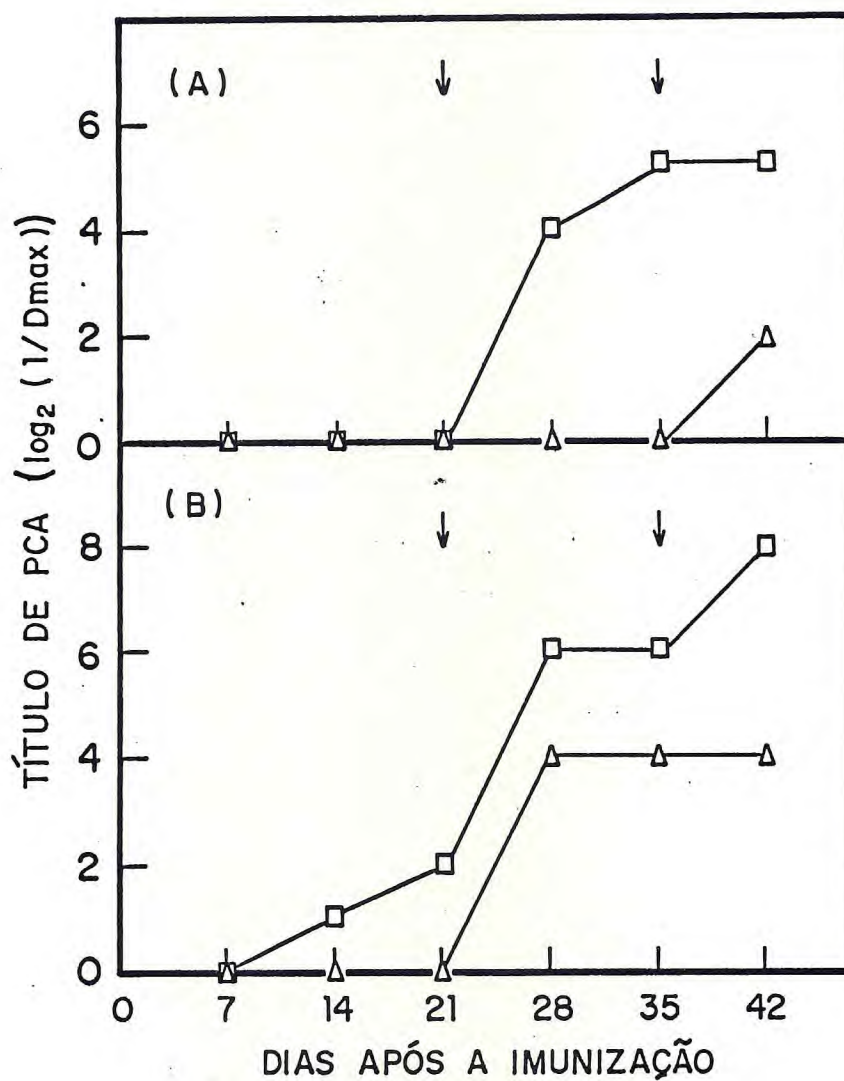


FIGURA 8 - Resposta do tipo IgG em camundongos imunizados por via subcutânea com 10 (A) e 100 µg (B) da fração ASL. As reações de PCA foram desencadeadas em camundongos, após um período de latência de 2 horas, com 250 µg de ASL (□—□), 250 µg de AP (△—△). As setas indicam os dias de aplicação dos reforços.

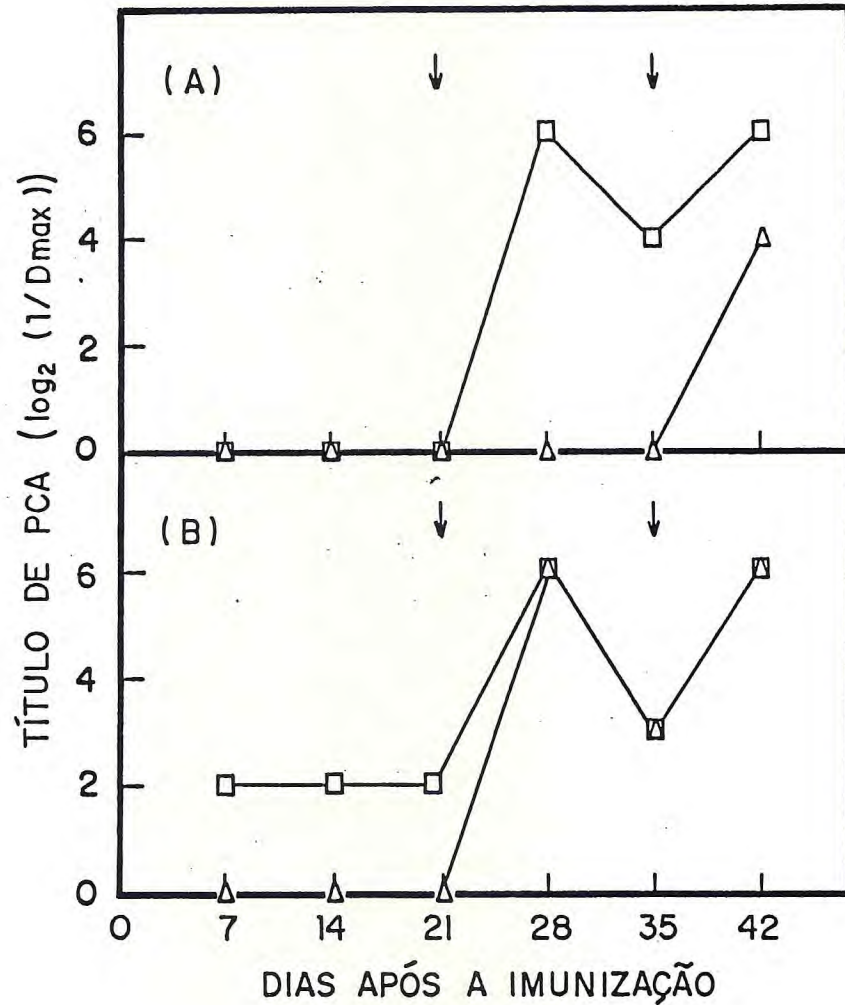


FIGURA 9 - Resposta do tipo IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10 (A) e 100 µg (B) da fração ASL. As reações de PCA foram desencadeadas em ratos, após um período de latência de 18 horas, com 1,5 mg de ASL (□—□), 1,5 mg de AP (△—△). As setas indicam os dias de aplicação dos reforços.

### 3.4.1 - Resposta do Tipo IgG

Para os camundongos imunizados com 10  $\mu$ g da fração ASL (FIGURA 8A), as reações de PCA desencadeadas com o antígeno específico (ASL) não revelaram síntese de IgG durante a resposta primária. Um título de 4 foi observado no 28º dia (7 dias após a aplicação do primeiro reforço), que se elevou para 5 aos 35 dias e manteve-se constante até o 42º dia após a imunização inicial. Quando as reações de PCA, para estes soros, foram desencadeadas com a fração AP foram observados títulos de PCA nulos até o 35º dia e um título com valor igual a 2 foi detectado no 42º dia. Para os animais sensibilizados com 100  $\mu$ g da fração ASL (FIGURA 8B), as reações de PCA desencadeadas com este antígeno revelaram síntese de IgG durante a resposta primária, apresentando título com valor 1 no 14º dia, que se elevou a 2 no 21º dia, a 6 com 28 e 35 dias e alcançou valor 8 aos 42 dias após a imunização inicial. As reações de PCA realizadas com estes soros e desencadeadas com a fração AP não detectaram síntese de IgG no decurso da resposta primária. Um título com valor 4 foi detectado aos 28 dias (7 dias após a aplicação do primeiro reforço), que se manteve inalterado até o final do experimento.

### 3.4.2 - Resposta do Tipo IgE

Em soro de camundongos imunizados com 10  $\mu$ g da fração ASL (FIGURA 9A), os títulos das reações de PCA desencadeadas com este antígeno foram nulos até o 21º dia, apresentando, porém, um valor de 6 aos 28 dias, caindo para 4 com 35 dias e elevando-se novamente a 6 no 42º dia após a imunização inicial. Quando as reações de PCA para estes soros foram desencadeadas com a fração AP, detectou-se síntese

se de anticorpos do tipo IgE somente no 42º dia após a imunização inicial, quando se observou título de PCA igual a 4. Para os animais imunizados com 100 µg da fração ASL (FIGURA 9B), as reações de PCA desencadeadas com o antígeno específico (ASL) revelaram títulos de IgE com valor 2 nos dias 7, 14 e 21, elevando-se a 6 no 28º dia, caindo para 3 com 35 dias e atingindo novamente o valor 6 no 42º dia. As reações de PCA para estes mesmos soros desencadeadas com a fração AP apresentaram títulos de PCA nulos durante a resposta primária. No decorrer da resposta secundária, a curva obtida com este antígeno foi idêntica à observada com a fração ASL (FIGURA 9B).

### 3.5 - Respostas dos Tipos IgG e IgE em Camundongos Imunizados por Via Subcutânea com a Fração Albumínica Processada (AP)

#### 3.5.1 - Resposta do Tipo IgG

Não foi detectada síntese de IgG em soro de camundongos imunizados por via subcutânea com 100 µg da fração AP, quando as reações de PCA foram desencadeadas com o antígeno específico (fração AP) ou com a fração ASL, na resposta primária bem como na resposta secundária.

#### 3.5.2 - Resposta do Tipo IgE

Não foi observada síntese de IgE em soro de camundongos imunizados por via subcutânea com 100 µg da fração AP, quando as reações de PCA foram desencadeadas com o antígeno específico ou com a fração ASL, ao longo de todo o experimento.

### 3.6 - Respostas dos Tipos IgG e IgE em Camundongos Imunizados por Via Subcutânea com a Fração Globulínica Total (GT)

Os títulos de PCA para as respostas dos tipos IgG e IgE obtidos pela imunização subcutânea de camundongos com 1, 10 e 100  $\mu\text{g}$  da fração GT, são mostrados nas FIGURAS 10 e 11 respectivamente. As reações de PCA foram desencadeadas com as frações GT, GSL e GSL + LP.

#### 3.6.11 - Resposta do Tipo IgG.

Para os camundongos imunizados com 1  $\mu\text{g}$  da fração GT (FIGURA 10A), as reações de PCA desencadeadas com este antígeno não revelaram síntese de IgG no decurso da resposta primária (7, 14 e 21 dias após a imunização inicial). Observou-se um título de 4 com 28 e 35 dias, que se elevou a 6 no 42º dia. Os testes de PCA realizados com estes mesmos soros e desencadeados com a fração GSL não detectaram síntese de IgG aos 7 e 14 dias. Um título com valor 1 foi observado no 21º dia, que se elevou a 4 com 28 dias e manteve-se inalterado até o 42º dia. Para os animais sensibilizados com 10  $\mu\text{g}$  da fração GT (FIGURA 10B), as reações de PCA desencadeadas com o mesmo antígeno não revelaram síntese de IgG aos 7, 14 e 21 dias. Detectou-se um título de PCA de 5 aos 28 dias, que se manteve constante aos 35 dias e alcançou valor 6 aos 42 dias após a imunização inicial. Para estes soros, as reações de PCA desencadeadas com a fração GSL não detectaram síntese de IgG com 7 e 14 dias. Observou-se um título de 1 no 21º dia, que aumentou para 5 com 28 dias e manteve-se constante aos 35 e 42 dias após a imunização inicial. Quando as reações de PCA, para estes mesmos soros, foram desencadeadas com a fração GSL + LP não se observou sín

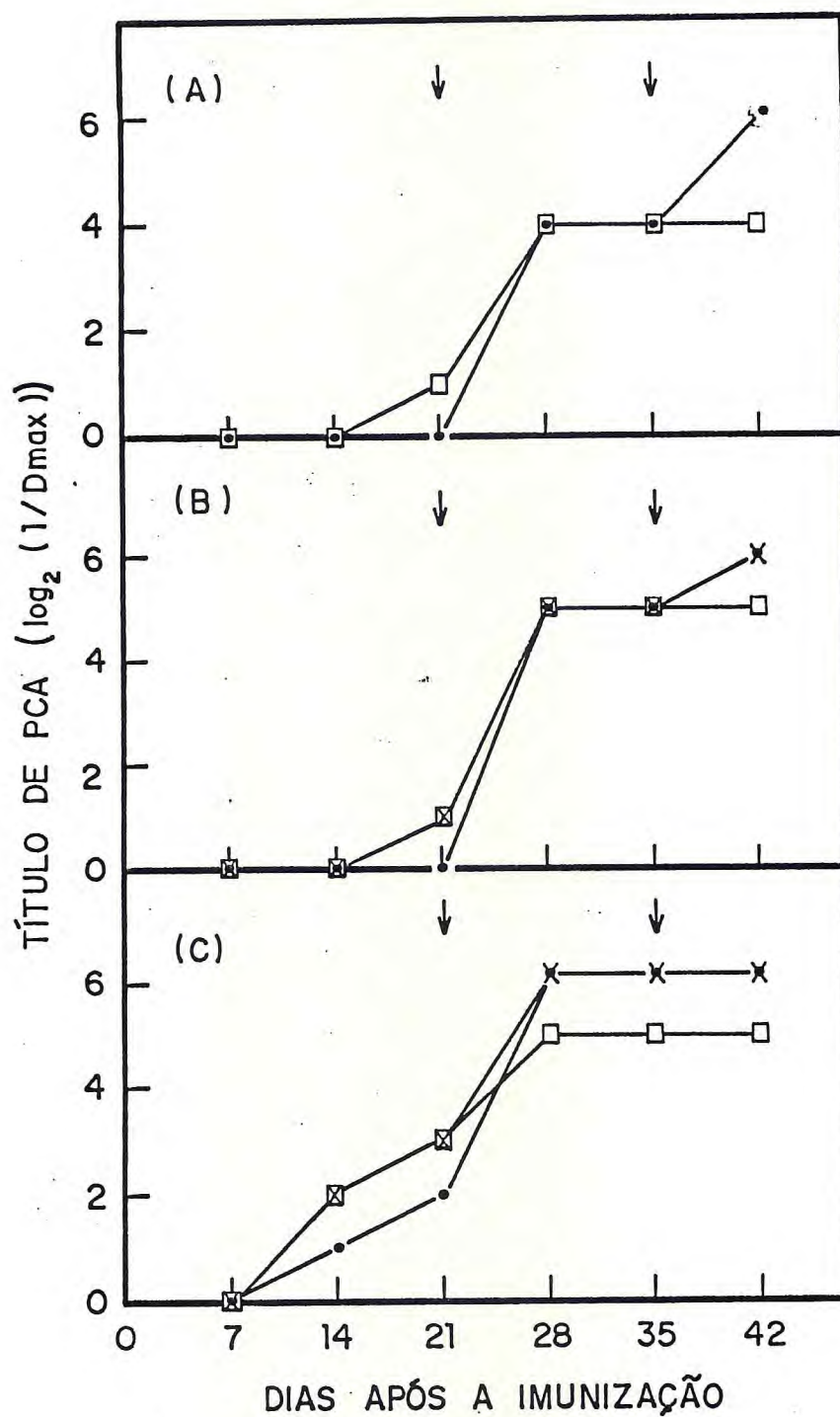


FIGURA 10 - Resposta do tipo IgG em camundongos imunizados por via subcutânea com 1 (A), 10 (B) e 100 µg (C) da fração GT. As reações de PCA foram desencadeadas em camundongos, após um período de latência de 2 horas, com 100 µg de GT (●—●), 250 µg de GSL (□—□), 200 µg de GSL + 50 µg de LP (x—x). As setas indicam os dias de aplicação dos reforços.

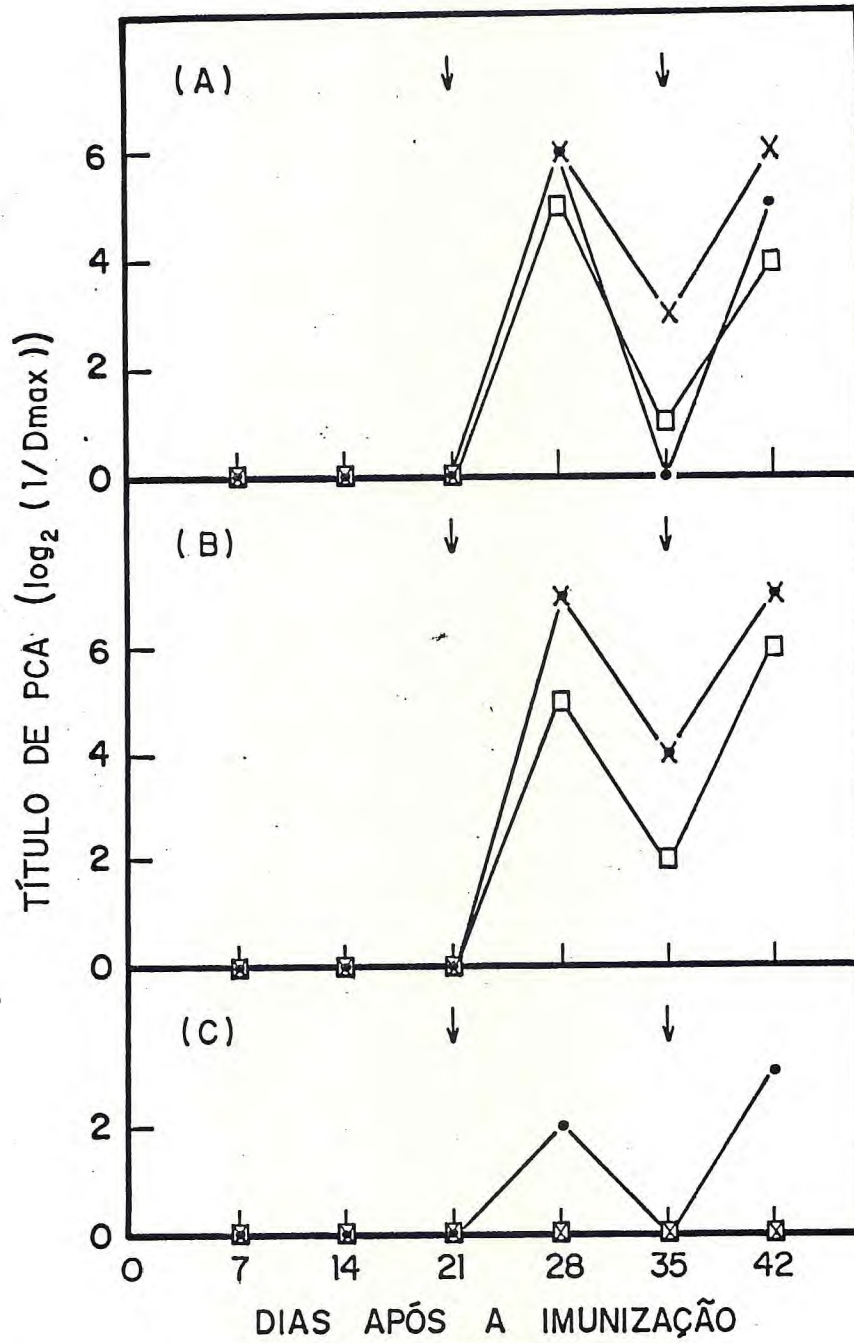


FIGURA 11 - Resposta do tipo IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 1 (A), 10 (B) e 100 µg (C) da fração GT. As reações de PCA foram desencadeadas em ratos, após um período de latência de 18 horas, com 500 µg de GT (●—●), 1,5 mg de GSL (□—□), 1,5 mg de GSL + 250 µg de LP (x—x). As setas indicam os dias de aplicação dos reforços.

tese de IgG aos 7 e 14 dias após a imunização inicial. Um título com valor 1 foi detectado com 21 dias, que se elevou a 5 no 28º dia, manteve-se inalterado aos 35 dias e alcançou o valor 6 no final do experimento. Em soro de camundongos imunizados com 100 µg da fração GT (FIGURA 10C), as reações de PCA desencadeadas com este mesmo antígeno revelaram síntese de IgG durante a resposta primária, a partir do 14º dia com título de PCA igual a 1, que se elevou a 2 com 21 dias, alcançou um valor de 6 aos 28 dias e manteve-se inalterado aos 35 e 42 dias após a imunização inicial. Para estes mesmos soros, no decurso da resposta primária, foram observados títulos de PCA idênticos, quando as reações foram desencadeadas tanto com a fração GSL quanto com a fração GSL + LP. A síntese de IgG foi revelada somente a partir do 14º dia, com título de PCA igual a 2, que atingiu o valor 3 aos 21 dias. No que diz respeito à resposta secundária, verificou-se que os valores dos títulos de PCA mantiveram-se constantes com valores de 5 para as reações de PCA desencadeadas com a fração GSL e 6 para as reações desencadeadas com a fração GSL + LP.

### 3.6.2 - Resposta do Tipo IgE

Para os camundongos imunizados com 1 µg da fração GT (FIGURA 11A), não se observou síntese de IgE específica, durante a resposta primária, quando as reações de PCA foram desencadeadas com as frações GT, GSL e GSL + LP. No decurso da resposta secundária, quando as reações de PCA foram desencadeadas com a fração GT observou-se um título de 6 aos 28 dias, que caiu a zero aos 35 dias e elevou-se a 5 com 42 dias após a imunização inicial. As reações de PCA desencadeadas com a fração GSL revelaram um título de 5 no 28º dia, que caiu para 1 com 35 dias e elevou-se a 4 aos 42 dias (7 dias após a aplicação do segundo reforço). As reações de

PCA desencadeadas com a fração GSL + LP mostraram um título com valor 6 aos 28 dias, que caiu a 3 no 35º dia e elevou-se novamente a 6 aos 42 dias após a imunização inicial. Em soro de animais sensibilizados com 10 µg da fração GT (FIGURA 11B), também não foi detectada síntese de IgE no decurso da resposta primária, quando as reações de PCA foram desencadeadas com quaisquer das frações antigênicas, GT, GSL e GSL + LP. No decorrer da resposta secundária, as reações de PCA desencadeadas com a fração GT revelaram um título de 7 aos 28 dias, que caiu para 4 aos 35 dias e elevou-se novamente a 7 no 42º dia. Usando-se a fração GSL, como antígeno desencadeante das reações de PCA, observou-se um título de 5 no 28º dia, que caiu para 2 com 35 dias e aumentou para 6 no 42º dia (7 dias após a aplicação do segundo reforço). Quando as reações de PCA foram desencadeadas com a fração GSL + LP reconstituiu-se uma curva idêntica à obtida com a fração GT. Para os camundongos imunizados com 100 µg da fração GT (FIGURA 11C), a semelhança do que foi observado com as doses de 1 e 10 µg (FIGURA 11A, B), não se detectou síntese de IgE, no decurso da resposta primária, quando as reações de PCA foram desencadeadas com a fração GT. Durante a resposta secundária, observou-se um título de 2 com 28 dias, que caiu a zero no 35º dia e aumentou para 3 com 42 dias após a imunização inicial. Para estes mesmos soros, quando as reações de PCA foram desencadeadas com as frações GSL e GSL + LP não foi observada síntese de IgE na resposta primária bem como na resposta secundária.

### 3.7 - Respostas dos Tipos IgG e IgE em Camundongos Imunizados por Via Subcutânea com a Fração Globulínica Sem Lectina (GSL)

Os títulos de PCA para as respostas dos tipos IgG e IgE obtidos pela imunização de camundongos por via

subcutânea com 10 e 100  $\mu\text{g}$  da fração GSL, são mostrados nas FIGURAS 12 e 13 respectivamente. As reações de PCA foram desencadeadas com as frações GSL e GP.

### 3.7.1 - Resposta do Tipo IgG

Para os camundongos imunizados com 10  $\mu\text{g}$  da fração GSL (FIGURA 12A), as reações de PCA desencadeadas com este antígeno não revelaram síntese de IgG no 7º dia após a imunização inicial. Aos 14 e 21 dias, os resultados mostraram título de PCA 1, elevando-se a 5 com 28 e 35 dias e alcançando valor 6 aos 42 dias. Os testes de PCA realizados com os mesmos soros e desencadeados com a fração GP revelaram síntese de IgG somente a partir do 21º dia, após a imunização inicial, quando apresentou título de PCA com valor igual a 1, sendo observado nos demais dias do período experimental títulos idênticos aos obtidos com a fração GSL. Com animais imunizados com 100  $\mu\text{g}$  da fração GSL (FIGURA 12B), as reações de PCA desencadeadas com o mesmo antígeno não mostraram síntese de IgG aos 7 dias após a imunização inicial. Com 14 dias observou-se um título de 2, que aumentou para 3 aos 21 dias, para 6 aos 28 dias e atingiu valor 8 aos 42 dias. Para os mesmos soros foram feitas reações de PCA desencadeadas com a fração GP. Neste caso, não foi detectada síntese de IgG aos 7 e 14 dias após a imunização inicial. Somente no 21º dia foi observado um título de PCA com valor 1, que se elevou para 6 nos 28º e 35º dias e aumentou para 8 no 42º dia.

### 3.7.2 - Resposta do Tipo IgE

Para os camundongos imunizados com 10  $\mu\text{g}$  da fração GSL (FIGURA 13A), não foi detectada síntese de IgE no decur

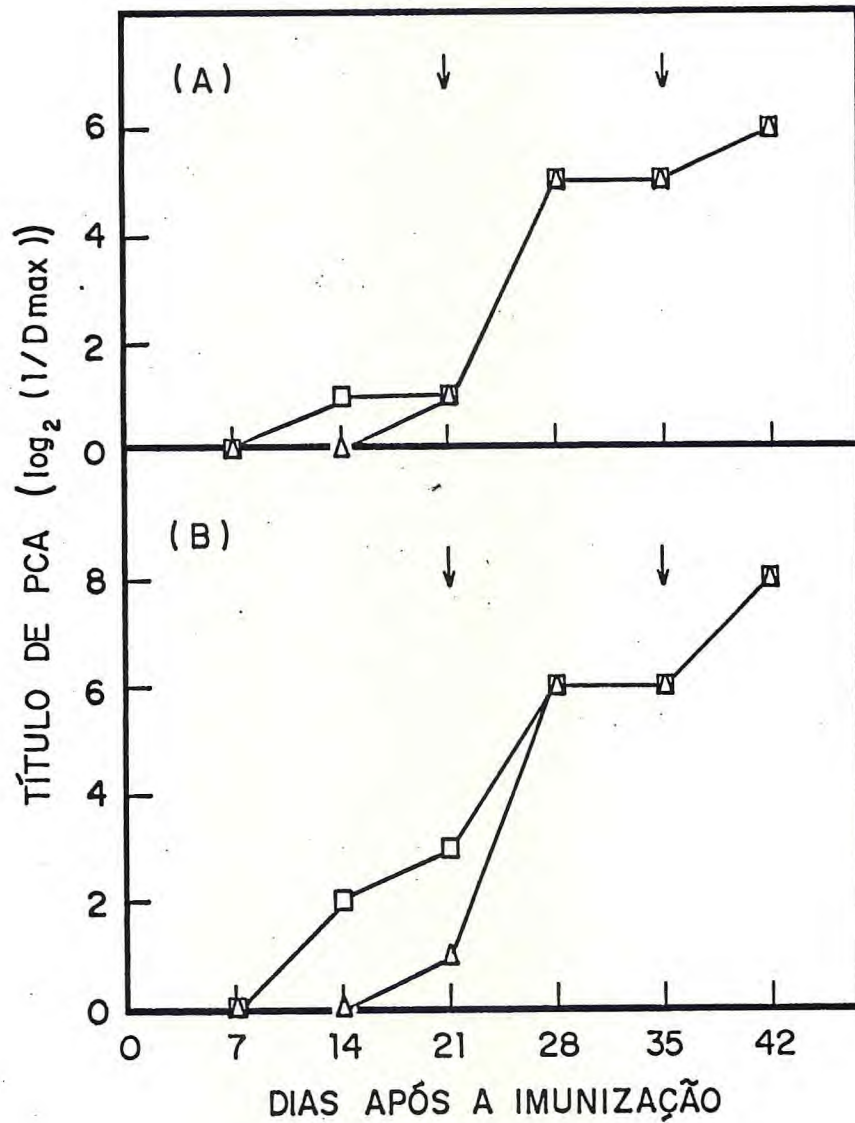


FIGURA 12 - Resposta do tipo IgG em camundongos imunizados por via subcutânea com 10 (A) e 100 µg (B) da fração GSL. As reações de PCA foram desencadeadas em camundongos, após um período de latência de 2 horas, com 250 µg de GSL (□—□), 250 µg de GP (△—△). As setas indicam os dias de aplicação dos reforços.

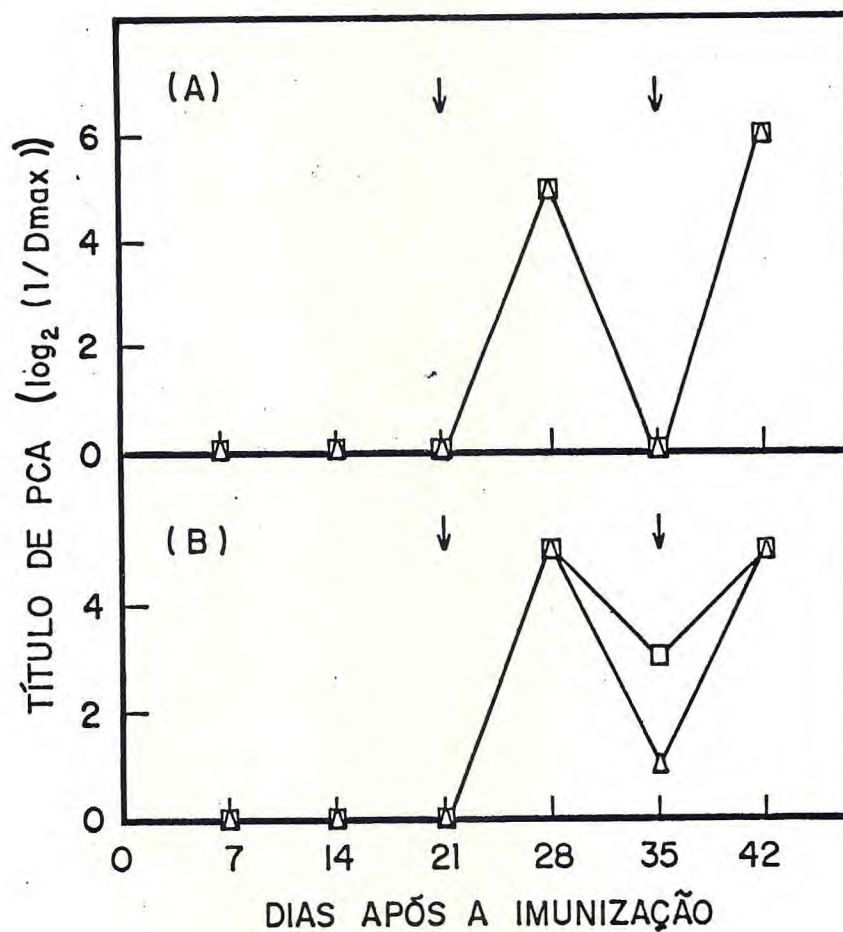


FIGURA 13 - Resposta do tipo IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 10 (A) e 100 µg (B) da fração GSL. As reações de PCA foram desencadeadas em ratos, após um período de latência de 18 horas, com 1,5 mg de GSL (□—□), 1,5 mg de GP (△—△). As setas indicam os dias de aplicação dos reforços.

so da resposta primária, por reações de PCA desencadeadas com a fração GSL. Observou-se um título de 5 com 28 dias, que caiu para zero com 35 dias e elevou-se a 6 no 42º dia (7 dias após a aplicação do segundo reforço). As reações de PCA realizadas com estes mesmos soros e desencadeadas com a fração GP, revelaram títulos idênticos aos obtidos com a fração GSL para todos os dias testados. Para os animais sensibilizados com 100 µg da fração GSL (FIGURA 13B), não foi observada síntese de IgE durante a resposta primária, quando as reações de PCA foram desencadeadas tanto com a fração GSL quanto com a fração GP. No decurso da resposta secundária, quando as reações de PCA foram desencadeadas com a fração GSL detectou-se um título de 5 com 28 dias, que caiu para 3 com 35 dias e elevou-se novamente a 5 no 42º dia. Já as reações desencadeadas com a fração GP detectaram um título de PCA com valor 5 aos 28 dias, que caiu para 1 com 35 dias e elevou-se novamente a 5 aos 42 dias.

### 3.8 - Respostas dos Tipos IgG e IgE em Camundongos Imunizados por Via Subcutânea com a Fração Globulínica Processada (GP)

Os títulos de PCA para as respostas dos tipos IgG e IgE obtidos pela imunização subcutânea de camundongos com 100 µg da fração GP, são mostrados na FIGURA 14. As reações de PCA foram desencadeadas com as frações GP e GSL.

#### 3.8.1 - Resposta do Tipo IgG

As reações de PCA realizadas com soro de animais sensibilizados com 100 µg da fração GP (FIGURA 14A) e desencadeadas com este antígeno revelaram síntese de IgG durante a

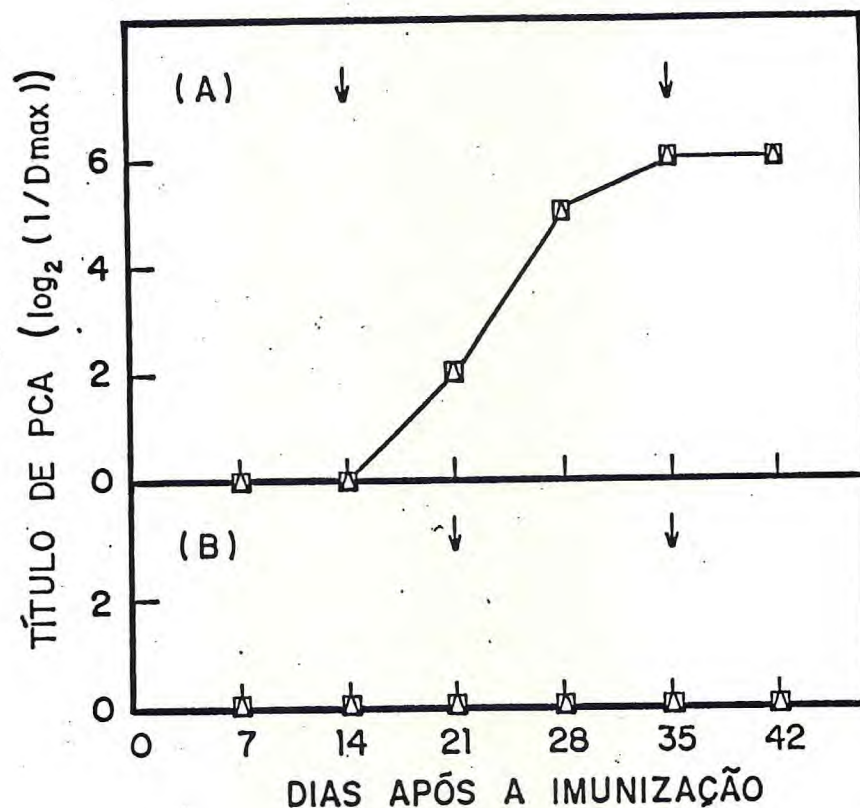


FIGURA 14 - Respostas dos tipos IgG e IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 100  $\mu$ g da função GP. A) Resposta do tipo IgG. As reações de PCA foram desencadeadas em camundongos, após um período de latência de 2 horas, com 250  $\mu$ g de GP ( $\Delta$ — $\Delta$ ), 250  $\mu$ g de GSL ( $\square$ — $\square$ ); B) Resposta do tipo IgE. As reações de PCA foram desencadeadas em ratos, após um período de latência de 18 horas, com 1,5 mg de GP ( $\Delta$ — $\Delta$ ), 1,5 mg de GSL ( $\square$ — $\square$ ). As setas indicam os dias de aplicação dos reforços.

resposta primária, porém somente com 21 dias após a imunização inicial, apresentando título de 2, que se elevou a 5 com 28 dias e alcançou valor 6 aos 35 e 42 dias. Os títulos das reações de PCA para estes soros, desencadeadas com a fração GSL, mostraram-se idênticos aos obtidos com a fração GP.

### 3.8.2 - Resposta do Tipo IgE

Em soro de camundongos imunizados com 100 µg da fração GP (FIGURA 14B), as reações de PCA desencadeadas com as frações GP e GSL apresentaram títulos nulos ao longo de todo o experimento.

### 3.9 - Respostas dos Tipos IgG e IgE em Camundongos Imunizados por Via Subcutânea com Ovalbumina em Ausência e Presença de Diferentes Doses da Fração Lectínica Purificada (LP)

Os títulos de PCA para as respostas dos tipos IgG e IgE obtidos pela imunização de camundongos por via subcutânea com 100 µg de OVA, 100 µg de OVA + 5 µg da fração LP e 100 µg de OVA + 50 µg da fração LP, são mostrados nas FIGURAS 15 e 16 respectivamente. As reações de PCA foram desencadeadas com OVA.

#### 3.9.1 - Resposta do Tipo IgG

Para os camundongos imunizados com 100 µg de OVA (FIGURA 15), as reações de PCA revelaram síntese de IgG com 14 e 21 dias, após a imunização inicial, quando apresentaram título 1, elevando-se a 8 com 28 dias e chegando a 9 no

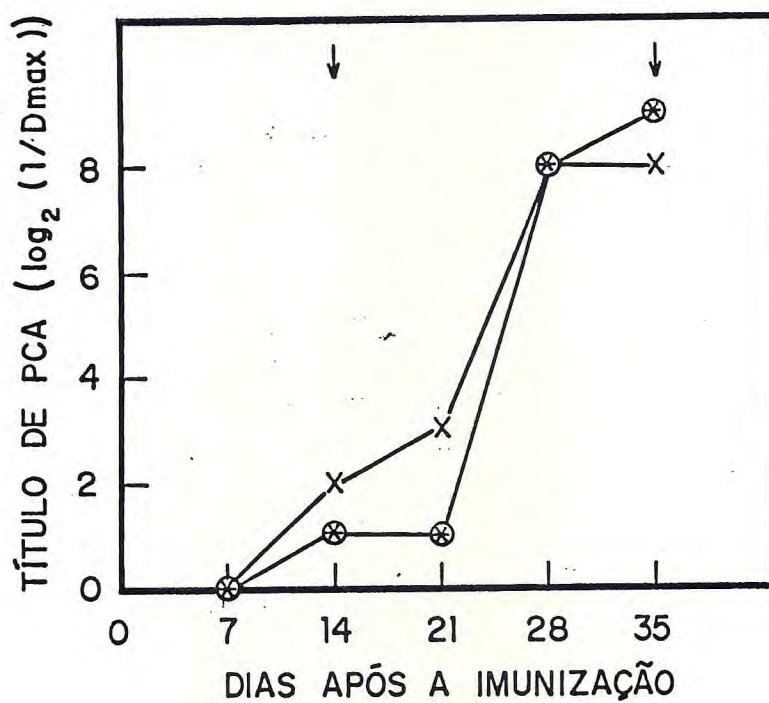


FIGURA 15 - Resposta do tipo IgG em camundongos imunizados por via subcutânea com 100 µg de OVA (○—○), 100 µg de OVA + 5 µg de LP (×—×), 100 µg de OVA + 50 µg de LP (\*—\*). As reações de PCA foram desencadeadas em camundongos, após um período de latência de 2 horas, com 250 µg de OVA.

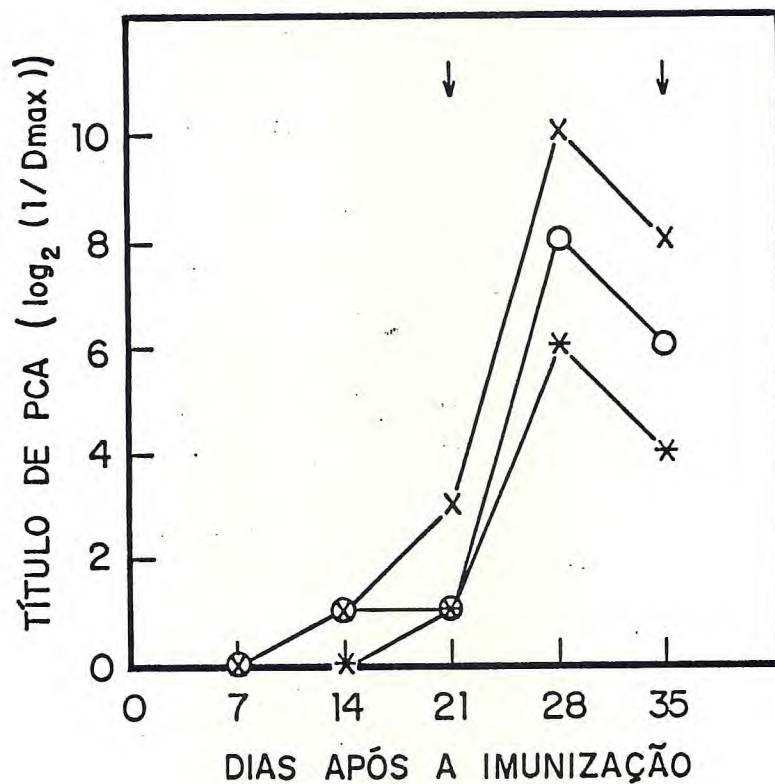


FIGURA 16 - Resposta do tipo IgE em camundongos imunizados por via subcutânea com 100 µg de OVA (○—○), 100 µg de + 5 µg de LP (×—×), 100 µg de OVA + 50 µg de LP (\*—\*). As reações de PCA foram desencadeadas em ratos, após um período de 1ª tência de 18 horas, com 1,5 mg de OVA.

35º dia. Em soro de animais sensibilizados com 100 µg de OVA associada a 5 µg da fração LP (FIGURA 15), as reações de PCA detectaram síntese de IgG aos 14 dias, após a imunização inicial, quando se observou título igual a 2, que aumentou para 3 com 21 dias, para 8 com 28 dias e permaneceu constante até o 35º dia. Para os animais imunizados com 100 µg de OVA associada a 50 µg da fração LP (FIGURA 15), só foi detectada síntese de IgG a partir do 14º dia, com título de PCA igual a 1, que permaneceu constante aos 21 dias, aumentou para 8 com 28 dias e alcançou valor 9 aos 35 dias após a imunização inicial.

### 3.9.2 - Resposta do Tipo IgE

Para os camundongos imunizados com 100 µg de OVA (FIGURA 16), as reações de PCA detectaram síntese de IgE específica somente a partir do 14º dia, quando apresentaram título igual a 1, que permaneceu constante até o 21º dia, elevou-se para 8 com 28 dias e caiu a 6 no final do experimento. Em soro de animais imunizados com 100 µg de OVA associada a 5 µg de da fração LP (FIGURA 16), as reações de PCA detectaram síntese de IgE somente a partir do 14º dia com título igual a 1, que aumentou para 3 com 21 dias, alcançou valor 10 no 28º dia e caiu para 8 com 35 dias. Para os camundongos sensibilizados com 100 µg de OVA associada a 50 µg da fração LP (FIGURA 16), observou-se um título de PCA com valor 1 somente a partir do 21º dia, que se elevou a 6 com 28 dias e caiu para 4 no 35º dia após a imunização inicial.

#### 4 - DISCUSSÃO

##### 4.1 - Resposta do Tipo IgG em Camundongos Imunizados por Via Subcutânea com Diferentes Doses da Fração Albumínica Total (AT) e da Fração Globulínica Total (GT).

Os títulos de PCA que quantificaram a síntese de IgG em soro de camundongos imunizados por via subcutânea com diferentes doses da fração albumínica total (AT) e da fração globulínica total (GT) (FIGURAS 6 e 10), revelaram um perfil de síntese de IgG comparável ao obtido quando se usou um antígeno como a ovalbumina (FIGURA 4). Isto quer dizer que, com baixas doses do antígeno os títulos de PCA foram mais baixos e aumentaram com o aumento das doses e com os reforços do agente sensibilizante. (PROUVOST-DANON et al., 1972). Embora tenha havido concordância no perfil da síntese de IgG entre ovalbumina e as duas frações protéicas, AT e GT, de *Artocarpus integrifolia* L., no caso da fração albumínica total (AT), com dose sensibilizante de 1 µg não houve resposta do tipo IgG (FIGURA 6A). Com a dose de 10 µg da fração AT (FIGURA 6B), os títulos de PCA foram mais baixos quando comparados com aqueles obtidos pela imunização de camundongos com a mesma dose de 10 µg de ovalbumina (FIGURA 4B) ou da fração GT (FIGURA 10B). Com 100 µg da fração AT (FIGURA 6C), somente na resposta secundária, nos dias 35 e 42, após a imunização inicial, os títulos de PCA foram iguais aos revelados contra a fração GT (FIGURA 10C) e um pouco mais baixo do que os observados contra ovalbumina (FIGURA 4C), na mesma dose de 100 µg. Por outro lado, quando camundongos foram imunizados com 1, 10 e 100 µg da fração GT (FIGURA 10), a resposta do tipo IgG mostrou níveis de anticorpos semelhantes aqueles induzidos pela imunização sub-

cutânea de camundongos com as mesmas doses de 1, 10 e 100 µg de ovalbumina (FIGURA 4). Vale ressaltar que a ovalbumina utilizada, além de se encontrar no estado puro, é considerada um antígeno potente por sua alta capacidade imunogênica (PROUVOST-DANON, 1972). No caso das frações proteicas de jaca, elas são constituídas por uma mistura de proteínas cuja imunogenicidade é seguramente variada. Portanto, os títulos de IgG anti-GT tão altos quanto aqueles anti-OVA mostram uma alta imunogenicidade da fração GT. Por outro lado, é possível que a fração GT de jaca tenha maior capacidade imunogênica que a fração AT, devido ao fato de possuir proteínas com pesos moleculares mais elevados do que aqueles das proteínas que constituem a fração AT (OLIVEIRA, 1980). De acordo com UNANUE & BENACERRAF (1986), à medida que um antígeno aumenta em complexidade química, haverá maior oportunidade para que um indivíduo possua os linfócitos cooperadores, que reconhecem alguns ou todos os diferentes determinantes. Como a fração GT apresenta aproximadamente a mesma quantidade de lectina que a fração AT (resultados não mostrados), exclui-se com isso a possibilidade de atribuir-se a maior capacidade imunogênica da fração GT, à presença de maior quantidade de lectina.

Os títulos de IgG foram praticamente os mesmos quando se imunizou camundongos com baixas doses das frações AT ou GT (10 µg de AT e 1 e 10 µg de GT) se a solução desengateada continha todas as proteínas (AT ou GT) ou simplesmente os antígenos correspondentes a estas frações das quais a lectina fora retirada (FIGURAS 6 e 10). Contudo, a natureza aditiva da resposta do tipo IgG foi claramente demonstrada quando camundongos foram imunizados com alta dose (100 µg) das frações AT e GT (FIGURAS 6C e 10C). Portanto, com 100 µg dessas frações e durante a resposta secundária, os títulos de IgG das reações de PCA desencadeadas com os antígenos específicos (AT e GT) foram mais elevados do que os títulos obtidos tendo-se como antígenos desencadeantes as frações albumínica e globulínica sem a lectina (FIGURAS 6C e

10C). No caso da fração globulínica, este efeito aditivo foi comprovado quando se usou como antígeno desencadeante a fração GSL + LP e foram obtidos os mesmos títulos de PCA que aqueles observados com a fração GT (FIGURA 10C). Assim, parece que a formação de IgG específica se processa independentemente para cada mistura de proteínas usadas para a imunização e a lectina não exerce efeito imunomodulador sobre a produção de anticorpos do tipo IgG.

#### 4.2 - Resposta do Tipo IgE em Camundongos Imunizados por Via Subcutânea com Diferentes Doses da Fração Albumínica Total (AT) e da Fração Globulínica Total (GT).

Os títulos de PCA que quantificaram a síntese de IgE em soro de camundongos imunizados por via subcutânea com diferentes doses da fração albumínica total (AT) (FIGURA 7) e da fração globulínica total (GT) (FIGURA 11) mostraram durante a resposta secundária que, no caso de imunização com baixas doses de proteínas de jaca (10 µg de AT e 1 e 10 µg de GT) o perfil da síntese de IgE específica apresentou a forma clássica, onde baixas doses do antígeno induziram altos títulos de PCA. Estes resultados são comparáveis aos obtidos quando se imuniza camundongos com um antígeno como a ovalbumina (FIGURA 5) e confirmam os resultados obtidos por VAZ & LEVINE (1970), VAZ et al. (1970) e PROUVOST-DANON et al. (1977), nos quais a resposta do tipo IgE é mais intensa quando a dose do antígeno sensibilizante é baixa.

Aparentemente, devido à diferença na capacidade imunogênica das proteínas presentes nas frações albumínica e globulínica, no caso específico da fração albumínica, na dose sensibilizante de 1 µg não houve síntese de IgE (FIGURA 7A).

Considerando-se o fato de que a ovalbumina utilizada tinha alto grau de pureza, o comportamento das frações

protéicas de jaca, constituídas de uma mistura de diferentes proteínas, em concentrações abaixo das consideradas baixas quando se usa um bom antígeno como ovalbumina, ao induzir títulos de IgE tão altos quanto os observados quando se imuniza camundongos com baixas doses (10 µg de AT e 1 e 10 µg de GT), sugere a necessidade de outra explicação para o fato que não o da simples indução de mais altos títulos de IgE por baixas doses do antígeno sensibilizante. A explicação mais plausível é a de que a lectina, jacalina, presente entre as proteínas das frações de *Artocarpus integrifolia* L. desempenharia um papel regulador sobre a síntese de IgE. Já foi demonstrado que a jacalina é um potente mitógeno de linfócitos T e ativador policlonal de células B (BUNN-MORENO & CAMPOS-NETO, 1981). Desta maneira, a ação da jacalina sobre a síntese de anticorpos do tipo IgE poderá ser feita através do estímulo de subpopulações de linfócitos T-"helper". Ainda assim os títulos de IgE induzidos pelos antígenos da jaca são baixos como também o são os títulos de IgE anti-ovalbumina revelados nos camundongos usados no presente trabalho. Isto, possivelmente, se deve ao fato de estarmos diante de fatores genéticos que são conhecidos por exercerem profunda influência sobre a síntese de IgE (PROUVOST-DANON et al., 1977). A síntese de IgE anti-AT nas doses de 10 e 100 µg e anti-GT nas doses de 1, 10 e 100 µg só foi detectada após as doses de reforços, isto é, na resposta secundária (FIGURAS 7B, C e 11). Segundo análise da reatividade imunológica dos camundongos usados neste trabalho, a resposta primária é habitualmente fraca ou inexistente. (SOUZA-NUNES & SILVA LIMA, 1986). Neste caso, melhor será evitar maiores especulações sobre a resposta imunológica primária, sobretudo quando ela for negativa.

Com dose imunizante de 100 µg das frações AT e GT (FIGURAS 7C e 11C), houve uma inibição da resposta IgE até mais forte do que quando se usou um antígeno como a ovalbumina (FIGURA 5C). Como foi dito anteriormente, em estudos realizados por VAZ & LEVINE (1970), VAZ et al. (1970) e

PROUVOST-DANON et al. (1977), altas doses de um antígeno inibem a produção de anticorpos do tipo IgE. Portanto, considerando o fato da ovalbumina utilizada ser uma proteína pura e conhecida por ser um antígeno usado de modo corrente como padrão nos estudos de imunização (PROUVOST-DANON, 1972), e as frações AT e GT de jaca, uma mistura de proteínas, cuja imunogenicidade é seguramente variada, novamente sugerimos a interferência da ação moduladora da jacalina, presente entre as demais proteínas de *Artocarpus integrifolia* L. Como já foi dito, com baixas doses de AT e GT (10 µg de AT e 1 e 10 µg de GT) a produção de IgE foi estimulada, enquanto que, com 100 µg destas frações protéicas, a síntese de IgE foi fortemente inibida (FIGURAS 7 e 11).

Uma prova de que a lectina, jacalina, foi responsável por este efeito foi dada nas experiências em que os camundongos foram sensibilizados com 10 e 100 µg das frações protéicas de onde a lectina fora retirada (ASL e GSL). Nestes casos, os títulos de IgE não se apresentaram estimulados com baixa dose (10 µg) de ASL e GSL e nem inibidos com 100 µg de ASL ou GSL (FIGURAS 9 e 13). O mesmo efeito imunomodulador exercido pela jacalina sobre a síntese de IgE foi observado nos animais imunizados com uma proteína não relacionada, como a ovalbumina (100 µg) associada a baixas (5 µg) e altas (50 µg) doses de jacalina, como será discutido posteriormente.

Além do papel imunomodulador exercido pela jacalina sobre a síntese de IgE, foi também verificada a sua atividade imunogênica individual. Isto foi comprovado quando a reação de PCA foi desencadeada com o antígeno específico (GT), com uma mistura das frações albumínica ou globulínica sem lectina (ASL ou GSL) às quais foi adicionada lectina pura ou simplesmente com as frações ASL ou GSL (FIGURAS 7 e 11).

O efeito imunomodulador, dependente da dose, sobre a síntese de IgE não foi verificado sobre a síntese de anticorpos do tipo IgG, como discutido anteriormente, enfatizando assim, o caráter distinto dos dois sistemas de síntese

desses anticorpos (JARRETT, 1984). Estes dados confirmam o que já vem sendo dito, que a modulação da síntese de IgG é feita a nível de uma subpopulação de linfócitos T diferente daquela que regula a síntese de IgE (ASTORQUIZA & SAYAGO, 1984). A modulação da síntese de IgE por outra lectina, no caso a Con A, já tinha sido também observada por GOLLAPUDI & KIND (1975).

#### 4.3 - Respostas dos Tipos IgG e IgE em Camundongos Imunizados por Via Subcutânea com Ovalbumina em Ausência e Presença de Diferentes Doses da Fração Lectínica Purificada (LP)

Para verificar a ação imunomoduladora da jacalina sobre as respostas dos tipos IgG e IgE, camundongos foram imunizados com 100 µg de ovalbumina na presença de 5 ou 50 µg da fração lectínica purificada (LP) (FIGURAS 15 e 16). Os resultados obtidos comprovaram a ausência de ação moduladora, dependente da dose, da jacalina sobre a resposta IgG, pois não foram observadas diferenças apreciáveis nos níveis de PCA quando animais foram sensibilizados com ovalbumina em ausência ou presença de jacalina purificada (FIGURA 15). Por outro lado, o mesmo não ocorreu com a resposta do tipo IgE, que se mostrou estimulada por baixa dose (c.a. 5 µg) e fortemente inibida por alta dose (c.a. 50 µg) de jacalina, quando os resultados foram comparados com os de imunização simplesmente com ovalbumina (FIGURA 16); demonstrando, assim, que esta lectina desempenha um papel imunomodulador, dependente da dose, sobre os anticorpos do tipo IgE, mesmo quando induzidos por um antígeno não relacionado como a ovalbumina. Este fato vem corroborar a idéia do caráter distinto dos sistemas de síntese dos anticorpos do tipo IgE e do tipo IgG (JARRETT, 1984). Estes resultados estão também de acordo com a observação de um efeito modulador, dependente do tempo, da lectina PHA sobre a síntese de IgE

onde, igualmente, esta lectina não teve influência sobre a resposta IgG (ASTORQUIZA & SAYAGO, 1984). Como a jacalina é um reconhecido agente ativador policlonal de linfócitos T do sangue periférico humano (BUNN-MORENO & CAMPOS-NETO, 1981), é provável que a modulação da síntese de IgE se faça através da ativação de linfócitos T específicos para esta classe de anticorpos. Os resultados apresentados também sugerem que a jacalina pode ativar diferentes subpopulações de células T, dependendo da dose de sensibilização. Em baixas concentrações de jacalina predomina uma função "helper", enquanto que em altas doses, aparentemente, são ativadas células T supressoras específicas para IgE (GOLLAPUDI & KING, 1975; SILVA LIMA et al. 1986).

#### 4.4 - Respostas dos Tipos IgG e IgE em Camundongos Imunizados por Via Subcutânea com Diferentes Doses da Fração Albumínica Sem Lectina (ASL) e da Fração Globulínica Sem Lectina (GSL)

Com a finalidade de analisar melhor a ação da fração lectínica purificada (LP) sobre as respostas dos tipos IgG e IgE, animais foram sensibilizados com 10 e 100 µg de proteínas de jaca livres de lectina, ou seja, ASL (FIGURAS 8 e 9) e GSL (FIGURAS 12 e 13). Nos dois casos, a resposta IgG (FIGURAS 8 e 12) apresentou uma cinética de reação de acordo com a forma clássica de síntese destes anticorpos, onde os níveis séricos dos mesmos aumentam com o aumento da dose e com os reforços do agente sensibilizante (PROUVOST-DANON et al., 1972). Além disso, estes dados foram comparáveis aos revelados em camundongos imunizados com as mesmas doses (10 e 100 µg) de ovalbumina (FIGURAS 4, 8 e 12). Como já foi mencionado anteriormente, considerando-se o fato da ovalbumina utilizada ser uma proteína única e usada correntemente como padrão em estudos de imunização (PROUVOST-DANON, 1972), o comportamento das frações ASL e GSL, como

sendo constituídas de uma mistura de proteínas, cuja imunogenicidade é seguramente variada, ao induzir títulos de IgG semelhantes aos obtidos contra ovalbumina (FIGURAS 4, 8 e 12), sugere alta capacidade imunogênica destas frações protéicas.

Os títulos de IgG anti-ASL e anti-GSL (FIGURAS 8 e 12) apresentaram tendências comparáveis aos revelados em animais sensibilizados com 10 e 100 µg das frações AT e GT (FIGURAS 6 e 10). Este fato vem corroborar a idéia de que a síntese de IgG se processa do mesmo modo, independente da presença ou ausência da lectina, ou seja, a jacalina não exerce efeito imunomodulador, dependente da dose, sobre a síntese de anticorpos do tipo IgG.

No tocante à resposta do tipo IgE, foi verificado que os títulos destes anticorpos não se apresentaram estimulados quando os camundongos foram imunizados com 10 µg das frações ASL ou GSL e nem inibidos pela imunização dos animais com 100 µg das duas frações (FIGURAS 9 e 13), contrastando com os resultados obtidos dos experimentos em que os animais foram sensibilizados com as mesmas doses (10 e 100 µg) das frações AT e GT (FIGURAS 7 e 11). Estes resultados foram também discordantes daqueles obtidos pela sensibilização de animais com 100 µg de ovalbumina na presença de diferentes doses de jacalina (FIGURA 16). Como já foi dito anteriormente, os títulos de IgE anti-OVA associada a 5 µg de jacalina apresentaram-se estimulados, enquanto que a mesma dose (100 µg) de ovalbumina associada a 50 µg de jacalina induziu uma síntese de IgE, cujos títulos apresentaram-se inibidos quando comparados com os títulos de IgE anti-OVA somente (FIGURA 16). Assim, os experimentos de imunização com proteínas na presença de jacalina, seja, AT, GT ou OVA (FIGURAS 7, 11 e 16), apresentaram uma cinética de reação semelhante, ao passo que, a síntese de IgE anti-proteínas de jacalinas livres de lectina, ASL e GSL, assemelharam-se mais ao perfil da síntese destes anticorpos contra OVA somente (FIGURAS 5, 9 e 13).

O perfil da síntese de IgE anti-ASL e anti-GSL com

prova, portanto, o efeito imunomodulador, dependente da dose, exercido pela jacalina sobre a síntese destes anticorpos.

#### 4.5 - Resposta do Tipo IgG em Camundongos Imunizados por Via Subcutânea com as Frações Albumínica Processada (AP) e Globulínica Processada (GP)

A imunogenicidade das frações protéicas (albumínica e globulínica) de sementes de jaca foi preliminarmente estudada após modificação introduzida pelo calor.

A resposta do tipo IgG induzida pela fração globulínica processada (GP) apresentou cinética de reação semelhante às obtidas em soros de animais sensibilizados com a mesma dose (100 µg) das frações globulínica total (GT) e sem lectina (GSL) (FIGURAS 10C, 12B e 14A). Estes resultados sugerem que o tratamento de cocção feito em sementes de jaca, pode não ter sido suficiente para provocar uma alteração significativa nas propriedades imunogênica e antigênica das proteínas da fração globulínica, uma vez que estas foram mantidas para a resposta do tipo IgG. É possível, por outro lado, que as proteínas da fração globulínica tenham sido desnaturadas, porém sem perderem sua imunogenicidade. Concordando com isto, MARSH et al. (1970) observaram que alérgenos modificados pelo formaldeído retinham sua capacidade de induzir formação de anticorpos do tipo IgG que apresentavam, inclusive, reação cruzada com o alérgeno nativo.

No tocante à fração albumínica processada (AP), não foi detectada síntese de IgG em animais sensibilizados com 100 µg desta fração protéica, diferentemente do observado com a fração GP. Tal comportamento pode ser atribuído à presença de proteínas com diferentes pesos moleculares nas duas frações protéicas (AP e GP), como foi mostrado anteriormente por OLIVEIRA (1980). Sugerimos então, que a ação do

calor possa ter causado uma desorganização mais intensa na estrutura das proteínas albumínicas, que possivelmente são menos complexas, de modo que quando se usou 100 µg deste material para imunização dos animais, não havia uma quantidade suficiente de proteínas com capacidade efetiva para desencadear o mecanismo de síntese de anticorpos do tipo IgG. Pode também ser especulado que, no processo de cocção das sementes, estas proteínas tenham sido mais facilmente perdidas, uma vez que não temos provas factuais diretas de uma desnaturação total. Ao contrário, sabemos que algo da estrutura protéica foi mantido, uma vez que este material foi capaz de desencadear reação de PCA em soro de animais sensibilizados com a fração albumínica sem lectina (nativa) (FIGURA 8).

#### 4.6 - Resposta do Tipo IgE em Camundongos Imunizados por Via Subcutânea com as Frações Albumínica Processada (AP) e Globulínica Processada (GP).

No caso da resposta do tipo IgE específica, não se observou síntese destes anticorpos quando foram usadas doses de 100 µg das frações AP ou GP (fração GP FIGURA 14B). No que diz respeito à fração GP, este fato demonstra mais uma vez o funcionamento distinto dos sistemas de síntese de anticorpos do tipo IgE e do tipo IgG (JARRETT, 1984). Tudo indica que o mecanismo de produção de IgE é mais susceptível a modificações dos padrões clássicos. Assim é que, o tratamento pelo calor levou a um desaparecimento da capacidade imunogênica de ambas as frações para a síntese de IgE específica. Por outro lado, voltamos a chamar a atenção para o fato de que, no tocante à síntese de IgG, pelo menos a fração GP induziu a síntese destes anticorpos, mostrando provavelmente, o menor grau de exigências no mecanismo de produção da IgG.

No caso presente, as proteínas modificadas pelo calor e que não retiveram sua capacidade imonogênica, estavam íntegras o suficiente para reagir com os anticorpos do tipo IgE induzidos pelas frações ASL e GSL (nativas) (FIGURAS 9 e 13), demonstrando, portanto, possuírem ainda capacidade antigênica.

## 5 - CONCLUSÕES

- 1 - A capacidade imunogênica da fração globulínica de sementes de jaca foi mais elevada do que a da fração albumínica, estando presente entre as proteínas de ambas as frações, a jacalina;
- 2 - A lectina, jacalina, presente entre as proteínas de jaca, além de seu papel como alérgeno de origem vegetal, exerce um efeito imunomodulador, dependente da dose, sobre a síntese de anticorpos do tipo IgE. Doses baixas de jacalina estimulam a síntese de IgE e altas doses inibem-na;
- 3 - A lectina, jacalina, não exerce efeito imunomodulador sobre as imunoglobulinas do tipo IgG;
- 4 - O mesmo efeito imunomodulador, dependente da dose, exercido pela jacalina sobre a produção de IgE, anti-proteínas de sementes de jaca, foi igualmente demonstrado em proteínas não relacionadas, como a ovalbumina;
- 5 - O tratamento prévio das sementes pelo calor destruiu a imunogenicidade em termos de IgG da fração albumínica e não destruiu a da fração globulínica. Em ambas as frações, a antigenicidade foi mantida;
- 6 - O tratamento prévio das sementes, pelo calor, destruiu a imunogenicidade em termos de IgE, tanto da fração albumínica como da fração globulínica, retendo, contudo, a antigenicidade destas frações.

## 6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APPUKUTTAN, P.S., A. SUROLIA & B.K. BACHHAWAT. Isolation of two galactose - binding proteins from *Ricinus communis* by affinity chromatography. *Indian J. Biochem. Biophys.* 14, 382-384, 1977.
- ASTORQUIZA, M.I. & S. SAYAGO. Modulation of IgE response by phytohemagglutinin. *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 73, 367-369, 1984.
- AUB, J.C., C. TIESLAU & A. LANKESTER. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 50, 613-619, 1963. Citado por SHARON e LIS, 1977.
- AUB, J.C., B.H. SANFORD & M.N. COTE. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 54, 396, 1965. Citado por SHARON e LIS, 1977.
- BARTH, R.E. & O. SINGLA. Differential effects of Concanavalin A on T helper dependent and independent antibody responses. *Cell. Immunol.* 9, 96, 1973.
- BINAGHI, R.A. & A. PERRUDET - BADOUX. Activité additive des anticorps IgE et IgG<sub>a</sub> dans la réaction anaphylactique (PCA) chez le rat. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)* 127 C, 49-56, 1977.
- BIOZZI, G., M. SIQUEIRA, D. MOUTON, O.A. SANT'ANNA, C. STIFFEL, M.B. STEVES & Y. BOUTHILLIER. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)* 128 C, 393, 1977. Citado por PROUVOST-DANON et al., 1977.
- BUNN - MORENO, M.M. & A. CAMPOS - NETO. Lectin(s) extracted from seeds of *Artocarpus integrifolia* (jackfruit): potent and selective stimulator(s) of distinct human T and B cell functions. *J. Immunol.* 127 (2), 427-429, 1981.

- BURGER, M.M. & A.R. GOLDBERG. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 57, 359-366, 1967. Citado por SHARON e LIS, 1977.
- CRANE, I., H. LEUNG, S. BARWICK, S. PARTI & A. MEAGER. The preparation of interferon gamma - producing T-cell hybridomas from jacalin stimulated T lymphocytes and the SH9 T - cell line. *Immunology* 53, 855-859, 1984.
- EHRlich, P. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 17, 1218, 1891. Citado por ROTHBERG, R.M., S.C. KRAFT & S.M. MICHALEK. Systemic immunity after local antigenic stimulation of the lymphoid tissue of the gastrointestinal tract. *J. Immunol.* 111 (6), 1906-1913, 1973.
- ENGELFRIED, J.J. *J. Allergy* 11, 569, 1940. Citado por PERLMAN, 1980.
- GATEHOUSE, A.M.R. Antinutritional proteins in plants. In *Developments in Food Proteins*. B.J.F. HUDSON, ed., Elsevier Applied Science Publications 3, 245-270, London, 1984.
- GELL, P.G.H. & R.R.A. COOMBS. *Clinical aspects of immunology*. Blackwell Scient Publ. 1. Oxford, 1968.
- GOLDSTEIN, I., R.C. HUGHES, M. MONSIGNY, T. OSAWA & N. SHARON. What should be called a lectin? *Nature* 285 (5760), 66, 1980.
- GOLLAPUDI, V.S.S. & L. KIND. Enhancement of reaginic antibody formation in the mouse by Concanavalin A. *Inter. Archs Allergy appl. Immun.* 48, 94-100, 1975.
- HATCH, M.D. Has plant biochemistry finally arrived? *Tibs* 11 (1), 9-10, 1986.
- ISHIZAKA, K., T. KISHIMOTO, G. DELASPESSE & T. P. KING. Immunogenic properties of modified antigen E.I: Presence of specific determinants for T-cells in desaturated antigen and polypeptide chains. *J. Immunology.* 113 (1), 70-77, 1974.

ISHIZAKA, K., H. OKUDAIRA & T.P. KING. Immunogenic properties of modified antigen E. II: Ability of urea - desaturated antigen and  $\alpha$ -popyptide chain to prime T - cells specific for antigen E. *J. Immunol.* 114 (1), 110-115, 1975.

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

KISHIMOTO, T. IgE class - specific supressor T cells and regulation of the IgE response. *Prog. Allergy* 32, 265-317, 1982.

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

LAYTON, L.L., E. YAMANAHHA & T.W. GREEN. *J. Allergy* 33, 232-235, 1962. Citado por PERLMAN, 1980.

LEHRER, S.B. Role of mouse IgG and IgE homocitotropic antibodies in passive cutaneous anaphylaxis. *J. Immunology* 32, 507-511, 1977.

LIS, H. & N. SHARON. Biological properties of lectins. In *The Lectins: properties, functions and applications in biology and medicine*. I.E. LIENER, N. SHARON, I. J. GOLDSTEIN, eds. Academic Press Inc, 265-291. Orlando, 1986.

MALKIN, J.I. & M. MARKOW. *J. Allergy* 10, 337-341, 1938. Citado por PERLMAN, 1980.

MARSH, D.G., L.M. LICHTENSTEIN & D.H. CAMPBELL. Studies on "allergoids" prepared from naturally occurring allergens. I: Assay of allergenicity and antigenicity of formalinised rye group 1 component. *Immunology* 18, 705-722, 1970.

- MARSH, D.G., L.M. LICHTENSTEIN & P.S. NORMAN. Induction of IgE-mediated immediate hypersensitivity to group 1 rye grass pollen allergen and allergoids in non-allergic man. *Immunology* 22, 1013, 1972.
- MOREIRA, R.A. & J.C. PERRONE. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris* Plant. *Physiol.* 59, 783-787, 1977.
- MOREIRA, R.A. & I.L. AINOUIZ. Isolectins from jackfruit (*Artocarpus integrifolia* L) seeds. *Plant Physiol.* 61 (suppl. 118). Abstract 650, 1978.
- MOREIRA, R.A. & I.L. AINOUIZ. Lectins from seeds of jack fruit (*Artocarpus integrifolia* L.): Isolation and purification of two isolectins from the albumin fraction. *Biol. Plantarum* 23(23); 186-192, 1981.
- MOREIRA, R.A. & J.T.A. OLIVEIRA. Comparative studies of seed proteins of the genus *Artocarpus* with respect to lectins. *Biol. Plantarum* 25(5), 336-342, 1983.
- MOREIRA, R.A. & J.T.A. OLIVEIRA. Lectins from the genus *Artocarpus*. *Biol. Plantarum* 25(5), 343-348. 1983.
- MOREIRA, R.A., A.C. HORTA-BARROS, J.C. STEWART & A. PUSZTAI. Isolation and characterization of a lectin from seeds of *Dioclea grandiflora* Mart. *Planta* 158, 63-69, 1983.
- MOTA, I. & D. WONG. Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse antisera during the course of immunization. *Life Sci.* 8, 813, 1969.
- NATERMAN, H.L. Formalinized pollen tannate in desensitization treatment. *J. Allergy* 28, 76-83, 1957.
- \_\_\_\_\_. Formalinized pollen protein precipitates with tannic acid or urea in desensitization treatment. *J. Allergy* 36, 226-233, 1965.

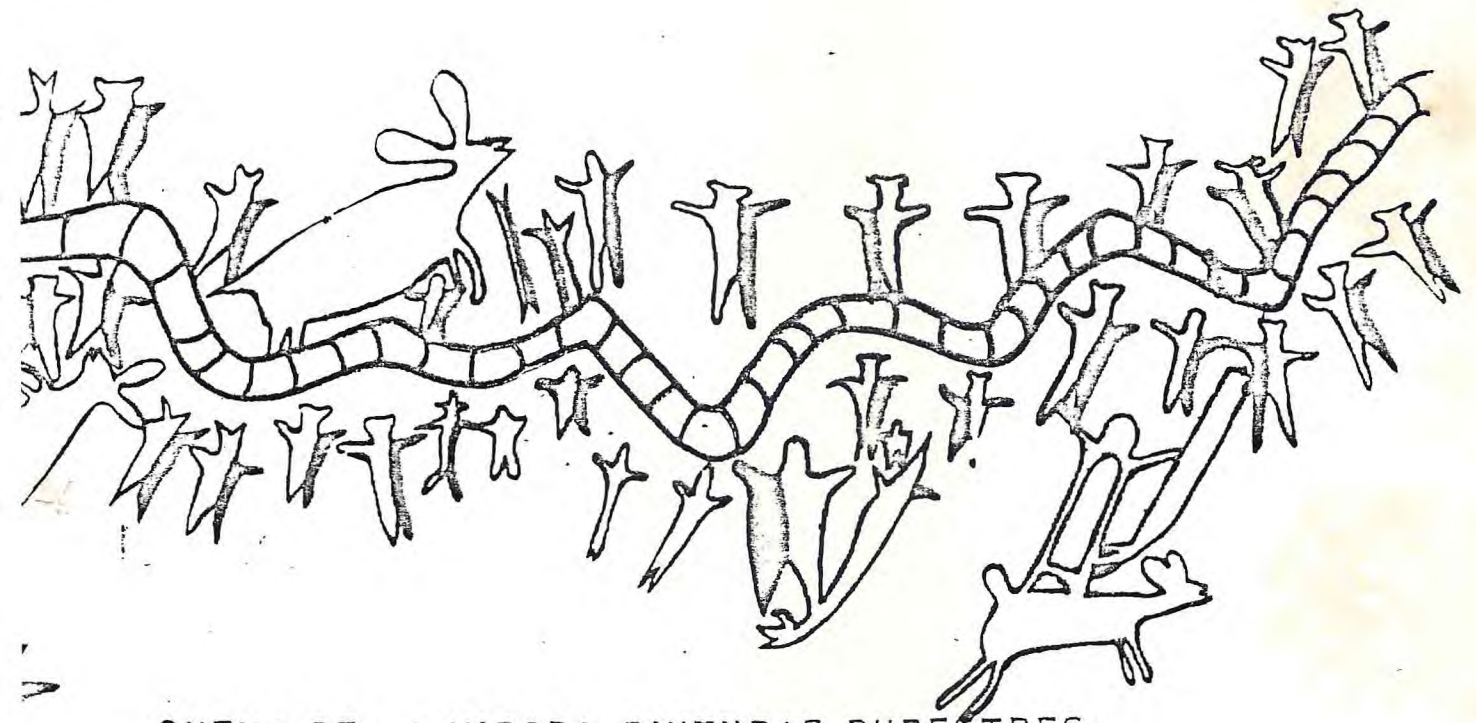
- NOWELL, P.C. *Cancer Res.* 20, 462-466, 1960. Citado por SHARON e LIS, 1977.
- OLIVEIRA, J.T.A. *Estudo comparativo das lectinas presentes em sementes de três representantes do gênero Artocarpus*. Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, 1980.
- OVARY, Z. Cutaneous anaphylaxis in the albinos rat. *Archs Allergy appl. Immunol.* 3, 292, 1952.
- OVERELL, B.G. Modified allergens. In *Immediate Hypersensitivity*. M.K. BACH, ed., Marcel Dekker, INC. New York and Basel, vol. 7, 779-797, 1978.
- PATTERSON, R., I.M. SUSZKO, J.J. PRUZANSKY, C.R. ZEISS, W. J. METZGER & M. ROBERTS. Polymerization of mixtures of grass allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 59(4), 314-319, 1977.
- PERLMAN, F. Allergens. In *Toxic constituents of plant foodstuffs*. 2nd, I.E. LIENER, ed., Academic Press, New York, London, Toronto, Sidney, San Francisco, 295-327, 1980.
- PINESS, G.I., H. MILLER, H.D. CARNAHAN, A.R. ALTOSE & R.C. HAWES. Relationships between foods as shown by the skin test in 1,000 children. *J. Allergy* 11(3), 251-265, 1940.
- PROUVOST-DANON, A., M. SILVA & M.Q. JAVIERRE. Active anaphylactic reaction in mouse peritoneal mast cell *in vitro*. *Life Sci.* 5, 289-297, 1966.
- PROUVOST-DANON, A. *Anticorps réagínicos de la souris. Production et propriétés physico-chimiques, immuno-chimiques et biologiques*. Thèse de doctorat d'Etat es Sciences Naturelle. Université Paris VII, 1972.

- PROUVOST-DANON, A., R. BINAGHI, S. ROCHAS & Y. BOUSSAC-ARON. Immunochemical identification of mouse IgE. *Immunology* 23(4), 481-491, 1972.
- PROUVOST-DANON, A., J. WICZOLKOWSKA, R. BINAGHI & A. ABADIE. Mouse and rat IgE. Cross sensitization of mast cells and antigenic relationships. *Immunology* 29, 151-162, 1975.
- PROUVOST-DANON, A., D. MOUTON, A. ABADIE, J.C. MEVEL & G. BIOZZI. Genetic regulation of IgE and agglutinating antibody synthesis in lines of mice selected for high or low immune responsiveness. *Eur. J. Immunol.* 7, 342-348, 1977.
- PUSZTAI, A. The role in food poisoning of toxins and allergens from higher plants. In *Developments in Food Microbiology*. R. K. ROBINSON, ed., Elsevier Applied Science Publishers, London and New York, vol. 2, 179-194, 1986.
- RESTUM - MIGUEL, N. & A. PROUVOST - DANON. Effects of multiple oral dosing on IgE synthesis in mice: Oral sensitization by albumin extracts from seeds of jack fruit (*Artocarpus integrifolia*) containing lectins. *Immunology* 54, 497-504, 1985.
- RICHET, C. & P. PORTIER. De l'action anaphylactique de certains venins. *C. R. Soc. Biol.* 54, 170, 1902.
- ROIT, I. *Imunologia Bāsica*. 4.<sup>a</sup> edição, Livraria Atheneu, Rio de Janeiro, 1983.
- ROMBALL, C.C. & W. O. WEIGLE. The enhancing effect of mitogens on the *in vivo* immune response of rabbits. *J. Immunol.* 115, 556, 1975.
- ROQUE - BARREIRA, M.C. & A. CAMPOS - NETO. A method for the determination of secretory IgA using the lectin jacalin. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 17, 384, 1984.

- ROQUE - BARREIRA, M.C. & A. CAMPOS - NETO. Jacalin: an IgA binding lectin. *J. Immunol.* 134, 1740-1743, 1985.
- ROQUE - BARREIRA, M.C., F. PRAZ, L. HALBWACHS - MECARELLI, L.J. GREENE & A. CAMPOS - NETO. IgA affinity purification and characterization of the lectin jacalin. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 19 (2), 149-157, 1986.
- ROQUE - BARREIRA, M.C., H.F. TERENCE, A. CAMPOS - NETO, & L.J. GREENE. Somente um dos tipos de subunidades da jacalina reage com IgA. Livro de Resumos, FESBE, 439, 1987.
- SELA, M. Antigenicity: some molecular aspects. *Science* 166 (3911), 1365-1374, 1969.
- SHARON, N. & H. LIS. Lectins: their chemistry and application to immunology. In *the antigens*. M. SELA, ed., Academic Press, New York, San Francisco, London, vol. 4, 429-529, 1977.
- SILVA LIMA, M., D.A. ALBUQUERQUE, D.C.S. NUNES & A. PUSZTAI. The effects of jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) lectin on IgG and IgE synthesis in mice. *J. Glycoconjugates*. Enviado para publicação.
- SOUZA NUNES, D.C. & M.G. SILVA LIMA. Specific IgG and IgE responses in a swiss line of mice: Comparative studies. Regional Scientific Meeting on Laboratory Animals. 18-21 november, Águas de Lindóia - SP - Brazil, 1986. Abstract Book, 80.
- SPIESS, J.R., J.F. COULSON, D.C. CHAMBERS, H.S. BERTON, H. STEVENS & J.M. SHIMP. The chemistry of allergens. XI: Properties and composition of natural proteoses isolated from oilseeds and nuts by the CS - 1A procedure. *J. Amer. Chem. Soc.* 73, 3995-4001, 1951.

- STULL, A., R.A. COOKE, W.B. SHERMAN, S. HEBALD & S.F. HAMPTON. Experimental and clinical study of fresh and modified pollen extracts. *J. Allergy* 11, 439-465, 1940. Citado por OVERELL, 1978.
- SURESHKUMAR, G.S., P.S. APPUKUTTAN & D. BASU.  $\alpha$ -D-galactose specific lectin from jackfruit (*Artocarpus integra*) seed. *J. Biosci.* 4, 257-261, 1982.
- YOULE, R.J. & A.H.C. HUANG. Identification of the castor bean allergens as the albumin storage proteins in the protein bodies of castor bean. *Plant. Physiol.* 61, 1040-1042, 1978.
- YOULE, R.J. & A.H.C. HUANG. Albumin storage proteins and allergens in cottonseed. *J. Agric. Food Chem.* 27, 500-503, 1979.
- UNAUE, E.R. & B. BENACERRAF. *Imunologia*. 2<sup>a</sup> edição, Intermérica, Rio de Janeiro, 1986.
- VAZ, N.M. & B.B. LEVINE. Immune responses of inbred mice to repeated low doses of antigen: relationship to histocompatibility (H - 2) type. *Science* 168 (3933), 852-854, 1970.
- VAZ, N.M., E.M. VAZ & B.B. LEVINE. Relationship between histocompatibility (H - 2) genotype and immune responsiveness to low doses of ovalbumin in the mouse. *J. Immunol.* 104 (6), 1572-1574, 1970.

8 - COMUNICAÇÕES À CONGRESSOS



CUEVA DE LA VIBORA, PINTURAS RUPESTRES,

B.C.S.

INTERES 8

LA PAZ BCS

MEXICO

MODULATION OF IgE RESPONSE BY JACKFRUIT (Artocarpus integrifolia) LECTIN

M. Silva Lima, D.A. Albuquerque and Á. Pusztai. Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará. P.O. Box 1065. 60.000, Fortaleza, Ceará, Brazil.

Saline extracts of jackfruit contain a lectin (jacalin) which has a mitogenic and polyclonal activity on T and B lymphocytes respectively (Bunn-Moreno and Campos Neto, J. Immunol. 127:427-429, 1981). It has already been shown that PHA, a T-cell mitogen modulates the IgE synthesis, depending on timing of PHA inoculation (Astorguiza and Sayago, Int. Arch. Allergy appl. Immunol. 73:367-369, 1984). In this report we described a dose depending modulation of IgE synthesis, by jacalin. Swiss mice were subcutaneously immunized with 10 and 100  $\mu$ g of soluble seed proteins (SSP) of jackfruit containing ca. 50% lectin. IgG and IgE levels were detected by PCA, challenged with SSP and SSP lectin-free. IgE specific levels in mice immunized with 10  $\mu$ g of SSP were enhanced and with 100  $\mu$ g of SSP they were <sup>strongly</sup> inhibited. IgG specific synthesis started earlier when mice were immunized with 100 than 10  $\mu$ g of SSP and the levels of it increased paralelly with the SSP doses. Apparently, low doses of jacalin stimulate IgE class-specific T-helper cell populations and high doses stimulate IgE class-specific T-suppressor cell populations.

Supported by CNPq.

### IgG AND IgE ANTIBODY RESPONSES TO *ARTOCARPUS INTEGRIFOLIA* (JACKFRUIT) PROTEINS

M.G.S. LIMA\*, D.A. ALBUQUERQUE\*, D.C.S. NUNES\* and A. PUSZTAI\*\*

\**Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFCE, Fortaleza-CE*

\*\**The Rowett Research Institute, Bucksburn, Aberdeen, Scotland, U.K.*

All plant proteins are potentially antigenic. Jackfruit seed proteins have attracted attention mainly because of the presence among its proteins of the lectin, jacalin, known to have mitogenic and polyclonal activity on T and B lymphocytes respectively. Saline extract (SE) of jackfruit seeds was loaded on a cross-linked guar gum column to separate the lectin-free extract (LFE) from jacalin, which was eluted with 0.1 M galactose. Swiss mice were subcutaneously immunized with 10 and 100  $\mu$ g SE admixed with 10 mg Al(OH)<sub>3</sub> as adjuvant. Specific IgG and IgE were tested by passive cutaneous anaphylaxis (PCA) in mice and rats respectively and compared to an ovalbumin control sensitization. PCAs were challenged with SE or LFE in order to discriminate what was due to jacalin effect. SE induced synthesis of specific IgG and IgE. Kinetics of the IgG synthesis with low (10  $\mu$ g) and high (100  $\mu$ g) SE sensitizing doses were similar to the ovalbumin controls. The kinetics of IgE-specific synthesis was higher than the ovalbumin control with 10  $\mu$ g SE sensitizing doses. However, with 100  $\mu$ g SE-sensitizing doses, IgE SE-specific synthesis was considerably lower than for the ovalbumin control, and the IgE LFE-specific synthesis was suppressed. In conclusion, SE induces synthesis of anaphylactic antibodies and jacalin modulates IgE synthesis, apparently stimulating SE-specific IgE production at low doses and suppressing the LFE-specific synthesis with high doses, possibly through generation of suppressor T cells.

Research supported by CNPq.

<b>SIMPÓSIO</b>	<b>COLLOQUE</b>
<b>FRANCO</b>	<b>FRANCO</b>
<b>BRASILEIRO</b>	<b>BRÉSILIEN</b>
<b>DE QUÍMICA E</b>	<b>SUR LA CHIMIE ET</b>
<b>FARMACOLOGIA</b>	<b>LA PHARMACOLOGIE</b>
<b>DE SUBSTÂNCIAS</b>	<b>DES SUBSTANCES</b>
<b>NATURAIS</b>	<b>NATURELLES</b>
<b>EM INFLAMAÇÃO</b>	<b>EN INFLAMMATION</b>
<b>ALERGIA</b>	<b>ALLERGIE</b>
<b>E TROMBOSE</b>	<b>ET THROMBOSE</b>

Local e Data do Simpósio

**RIO-SHERATON HOTEL**  
**16 - 19 Novembro 1986**  
**Rio de Janeiro - R.J. - Brasil**

**RESUMOS -**

**RESUMES**

P13  
THE EFFECTS OF *Artocarpus integrifolia* AND *Dioclea grandiflora*  
LECTINS ON IgG AND IgE SYNTHESIS IN MICE. COMPARATIVE STUDIES.

Silvã Lima, M.G., Souza Nunes, D.C., Albuquerque, D.A. and  
\* Prouvost, A. A. Departamento de Bioquímica, UFC, Fortaleza,  
Ceará, Brasil. \* Institut Pasteur, Immunothérapie Expérimentale,  
Paris, France.

Lectins have been increasingly used in immunological studies. Thus, lectin from *Phaseolus vulgaris* and more recently a lectin from *Artocarpus integrifolia* (jacalin) have been shown to modulate IgE synthesis in mice. We describe here the comparative effects of jacalin and *D. grandiflora* (PIII) on specific IgG and IgE responses induced in mice subcutaneous immunization with jackfruit proteins (JP) and *D. grandiflora* (DGP) containing different amounts of either jacalin or PIII. When mice were immunized with 10 and 100 ug JP containing ca. 50% jacalin or with the same doses of DGP containing 20% PIII, the titres of IgG anti-JP and anti-DGP were practically the same. The titres of IgE in mice immunized with 10ug JP were high and with 100ug JP, there was a general suppression of IgE response. In mice immunized with 100 ug DGP, the titres of IgE not only were not suppressed, but they were increased. The diversity of the effect exerted by the two lectins requires further studies because of the great potential both from the theoretical and practical point of view on the use of different lectins in immunological studies.

Arq. Biol. Tecnol. 30(1), abr., 1987

### RC3

ALÉRGENOS DE SEMENTES DE Artocarpus integrifolia MODIFICADOS PELO CALOR.

D.A. ALBUQUERQUE e M.G. SILVA LIMA.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. C.P. 1065, Fortaleza, Ceará.

Várias tentativas de modificação da estrutura de alérgenos vêm sendo feitas no intuito não só de caracterizar a alergenicidade dos mesmos, como com finalidade terapêutica, bloqueando a síntese de anticorpos anafiláticos (B. G. Overell. In Immediate hypersensitivity. Ed. M.K. Bach. Marcel Dekker Inc. 779-797, 1978). Sementes de jaca foram submetidas a cocção por 90 minutos e secas em estufa a 80° durante 22 horas. As proteínas foram, a seguir, submetidas à precipitação salina. Camundongos Swiss foram imunizados com 100 µg de extrato protéico (ET) com gel de Al(OH)<sub>3</sub> por via subcutânea. Os níveis específicos de IgG e IgE séricos foram determinados por PCA. Os resultados mostram que os antígenos modificados pelo calor perderam a capacidade imunogênica em termos de IgE, porém mantiveram a capacidade imunogênica em termos de IgG. Contudo, os soros dos animais imunizados com os antígenos nativos (não modificados pelo calor) mostraram, por PCA desencadeada com os alérgenos modificados, a presença de anticorpos do tipo IgE e do tipo IgG. Por esta caracterização preliminar pode-se dizer que a modificação induzida pelo calor acarreta alteração de alergenicidade retendo porém, sua capacidade antigênica.

AUXÍLIO: CAPES e CNPq.

Arq. Biol. Tecnol. 30(1), abr., 1987

B26

PROTEINS OF JACKFRUIT - IgG AND IgE SPECIFIC RESPONSE - MODULATION BY JACALIN.

M. Silva Lima, D.A. Albuquerque and D.C. Sousa Nunes.

Dept. of Biochemistry and Molecular Biology, UFC. P.O. Box 1065. 60.000 Fortaleza-Ce.

In a previous work we have demonstrated the specific IgG and IgE responses induced in mice by Full extract of jackfruit (Artocarpus integrifolia) proteins. We have presently examined the immune response in terms of IgG and IgE induced in mice by subcutaneous immunization with jackfruit protein extract-lectin-free. Such fraction was obtained after passing the full protein extract through an affinity column of guar gum. Mice were subcutaneously immunized with 10 and 100 ug lectin-free protein extract admixed with  $Al(OH)_3$ . IgG and IgE levels were detected by short latency PCA in mice for IgG and long latency PCA in rats for IgE. The IgE levels increased with the immunizing dose of jackfruit protein extract lectin-free. IgE levels were not high with the low immunizing dose (10ug) as it was shown with 10 ug of jackfruit protein full extract containing jacalin. On the other hand a high immunizing dose of 100ug did not inhibit the IgE levels as it was done by immunizing mice with 100 ug of protein Full extract containing jacalin. These results and those obtained by immunizing mice with non related protein such as Ovalbumin in the presence of low(5ug) and high(50ug) doses of jacalin put in evidence the dose-dependent modulatory effect of jacalin on IgE synthesis.

Supported by CNPq.