

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
UNICAMP  
INSTITUTO DE BIOLOGIA



MARISTELA DELGADO 328

LECTINAS DE *Artocarpus integrifolia*  
ESTIMULAM PADRÃO DIFERENTE DE  
CITOCINAS

Orientador: Prof. Dr. JOÃO SANTANA DA SILVA

Co-Orientador: Prof. Dr. ANTONIO CAMPOS NETO

CAMPINAS-SP.  
Este exemplar corresponde à redação final 1993

da tese defendida pelo(a) candidato(a)

Maristela Delgado

e aprovado pela Comissão Julgadora.



João Santana da Silva  
Campinas, 17 de novembro de 1993

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual de  
Campinas, para obtenção do título de Mestre  
em Imunologia.

Delgado, Maristela

Lectinas de *Artocarpus integrifolia* estimulam padrão diferente de citocinas / Maristela Delgado. -- Campinas, 1993. 80p.; 28cm.

Tese (Mestrado -- Imunologia Básica) -- Univesidade Estadual de Campinas.

1. Lectinas. 2. Citocinas. 3. *Artocarpus integrifolia*. 4. Mitógenos

Ao meu marido Evaristo Orellana Alves,  
com amor e gratidão.

Aos meus pais, José Paulo e Ignêz, pelos  
esforços não poupados durante minha  
formação educacional.

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva, pela humildade e seriedade com os quais me ensinou os primeiros passos da pesquisa científica.

Ao Prof. Dr. Antonio Campos Neto, pela orientação neste trabalho e pela oportunidade de meu aprimoramento profissional.

## AGRADECIMENTOS

- Ao Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, por ter possibilitado a realização desta tese.
- Aos Professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelos cursos oferecidos, necessários e importantes para minha formação na área de Imunologia.
- À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Isabel Kinney Ferreira de Miranda Santos, pela amizade, assessoria e sugestões nesse trabalho.
- Ao José Orivaldo Mengel, pela amizade e colaboração nas sugestões.
- Aos amigos Virmondes Rodrigues Júnior e Auro Nomizo, pelos ensinamentos iniciais na área de Imunologia e incentivos.
- Às amigas de laboratório Deijanira, Patrícia, Alexandrina, Maria Angélica, Fabíola, Gláucia, Gislaine, Matilde, Maria e Therezinha, pelo companheirismo e incentivos constantes.
- À Patrícia Vianna Bonini e ao Ronaldo Sordi Campanini, pelo grande apoio na parte computacional deste trabalho e também pela amizade.
- À amiga da Turma de Pós-Graduação, Maria Tereza, por todas as ajudas e incentivos.
- À amiga Aparecida Maria Fontes pela correção dos manuscritos e pelo estímulo constante
- Aos funcionários Maria Meira de Oliveira Rossi, Therezinha Aparecida Cunha Lorenzzi, Adelino Rodrigues, Walter Aguilar, Ivo Mazucato, Edinelson Mazzoto, Júlio Anselmo de Siqueira e Terezinha de Oliveira Penatti pelo apoio técnico.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida, a qual possibilitou a realização deste trabalho.
- À todas as pessoas que, direta ou indiretamente, ajudaram na realização dessa tese, os meus sinceros agradecimentos.

"Tudo é vivido pela primeira vez e sem preparação. Como se um ator entrasse em cena sem nunca ter ensaiado. Mas, o que pode valer a vida, se o primeiro ensaio da vida já é a própria vida? É isso que faz com que a vida pareça sempre um esboço. No entanto, mesmo esboço não é a palavra certa, porque um esboço é sempre um projeto de alguma coisa, a preparação de um quadro, ao passo que o esboço que é sempre a nossa vida não é um esboço de nada, é um esboço sem quadro."

Milam Kundera em: "A insustentável leveza do ser."



# Í N D I C E

I - INTRODUÇÃO .....	01
1. Papel das Citocinas e das lectinas na resposta imune .....	02
1.1. Citocinas na regulação da resposta imune .....	03
1.2. Lectinas endógenas como moléculas de reconhecimento .....	11
2. Lectinas de plantas como ferramentas no estudo da imunorregulação .....	19
3. O extrato bruto de <i>A. integrifolia</i> e seu papel no estudo da interação lectina-carboidrato .....	22
II - OBJETIVOS .....	26
III - MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
1. Animais .....	29
2. Mitógenos e lectinas .....	29
3. Meio de cultura completo .....	30
4. Anticorpos monoclonais .....	30
5. Atividade mitogênica das diferentes lectinas contidas no extrato bruto (E.B) de sementes de <i>A. integrifolia</i> .....	30
6. Preparo de meios condicionados (M.C.) .....	31
7. Dosagem do fator de crescimento para células T (FCCT) .....	32
8. Dosagem de IL-3/GM-CSF .....	33
9. Dosagem de TNF .....	33
10. Dosagem de IL-6 .....	34
11. Dosagem de TGF- $\beta$ .....	34
12. Dosagem de IFN $\gamma$ .....	35

IV- RESULTADOS .....	37
1. Resposta proliferativa de células esplênicas murinas às lectinas purificadas do E.B. de sementes de <i>A. integrifolia</i> .....	38
2. Produção do fator de crescimento para células T (FCCT) por esplenócitos estimulados com diferentes lectinas .....	40
3. Caracterização do FCCT produzido por células esplênicas após estimulação com a fração Artocarpina (F.Arto) .....	40
4. Produção de TGF- $\beta$ por esplenócitos após estimulação com diferentes lectinas .....	43
5. Produção de TNF por esplenócitos após estimulação com diferentes lectinas .....	43
6. Produção de TNF por células esplênicas aderentes e não aderentes estimuladas com lectinas .....	46
7. Síntese de IL-6 por células esplênicas aderentes e não aderentes estimuladas com lectinas .....	46
8. Produção de IFN- $\gamma$ por esplenócitos após estimulação com diferentes lectinas .....	49
9. Produção de IL-3/GM-CSF por esplenócitos após estimulação com diferentes lectinas .....	51
V - DISCUSSÃO .....	53
VI - RESUMO .....	62
VII - SUMMARY .....	64
VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66

## ABREVIACÕES

***A. integrifolia*** - *Artocarpus integrifolia*

**BS-II** - Lectina tipo II de *Bandeiraea simplicifolia*

**cDNA** - DNA-complementar

**Células NK** - Células citotóxicas naturais

**Con-A** - Concanavalina-A

**Con-A-S** - Concanavalina-A-succinilada

**E.B.** - Extrato Bruto

**F.Arto** - Fração Artocarpina

**FCCT** - Fator de Crescimento de Células T

**G-CSF** - Fator estimulador de colônia - específico para granulócito

**Gal** - Galactose

**GM-CSF** - Fator estimulador de colônia - específico para granulócito/macrófago

**IL-1** - Interleucina-1

**IL-2** - Interleucina-2

**IL-3** - Interleucina-3

**IL-4** - Interleucina-4

**IL-5** - Interleucina-5

**IL-6** - Interleucina-6

**INF** - Interferon

**KHF** - Fator auxiliador de células "Killer"

**LAF** - Fator ativador de linfócito

**LcH-B** - Lectina tipo B de *Lens culinaris*

**M-CSF** - Fator estimulador de colônia - específico para macrófago

**M.C.-Con-A** - Meio condicionado de cultura estimulada com Con-A

**M.C.-E.B.** - Meio condicionado de cultura estimulada com E.B.

**M.C.-F.Arto** - Meio condicionado de cultura estimulada com F.Arto

**M.C.-Jacalina** - Meio condicionado de cultura estimulada com Jacalina

**M.C.-teste** - Meio condicionado teste

**MHC** - Complexo de histocompatibilidade principal

**MIF** - Fator inibidor de migração

**NAc** - N-acetil

**PHA** - Fitohemaglutinina

**PWM** - Mitógeno pokeweed

**STA** - Aglutinina de *Solanum tuberosum*

**TCR** - Receptor de célula T

**TGF- $\beta$**  - Fator transformador de proliferação- $\beta$

**TMF** - Fator mitogênico para timócito

**TNF** - Fator de necrose tumoral

**UEA** - Aglutinina de *Ulex europaeus*

## **I - INTRODUÇÃO**

## 1. PAPEL DAS CITOCINAS E DAS LECTINAS NA RESPOSTA IMUNE.

A resposta imune a antígenos não próprios resulta na rápida expansão de linfócitos efetores com especificidade para o antígeno indutor. Os linfócitos podem ser separados em duas populações principais, que são os linfócitos T e os linfócitos B. Os linfócitos T se originam de precursores da medula óssea e são dependentes do Timo para que sua maturação ocorra. Já os linfócitos B se originam de precursores da medula óssea e sua maturação parece ocorrer na própria medula óssea em mamíferos. Ambas as células apresentam grande heterogeneidade de funções e especificidade-antigênica.

A função predominante das células B é a produção de anticorpos específicos. Os receptores para antígeno nas células B são constituídos pelas duas cadeias leves e duas cadeias pesadas das imunoglobulinas, que são divididas em regiões variáveis e constantes. Nas regiões variáveis das imunoglobulinas aparecem sítios para ligação de antígenos. Após interação da imunoglobulina de superfície celular com seu específico antígeno, na presença de células T, as células B diferenciam em plasmócitos, que são os responsáveis pela produção dos anticorpos circulantes.

Já, a principal função das células T é de auxiliar as células B, outras células T, macrófagos, células citotóxicas naturais, entre outras, através de interações celulares diretas e através da secreção de linfocinas. As células T com estas funções são chamadas de células T auxiliares e expressam na sua superfície a molécula CD4. Algumas células T são também capazes de matar outras células que expressam antígenos não próprios e são então denominadas de células T citotóxicas. A maioria das células T citotóxicas expressam a molécula CD8 na sua superfície. A expressão de moléculas CD4 ou CD8 está geralmente correlacionada com a especificidade do receptor da célula T. Células T-CD4<sup>+</sup> reconhecem antígenos em associação com proteínas classe-II do complexo principal de

histocompatibilidade (MHC), enquanto que células T-CD8<sup>+</sup> reconhecem antígenos em associação com proteínas de classe-I do MHC.

Os receptores para os antígenos presentes nas células T (TCR) constituem um complexo molecular formado por várias cadeias constantes, coletivamente denominadas de complexo CD3, associadas não covalentemente à duas cadeias polimórficas que formam um heterodímero (TCR). Cada cadeia do heterodímero é dividida em regiões constantes e variáveis, as regiões variáveis formam um sítio para ligação de antígenos.

A principal diferença entre os receptores de antígenos nas células T e B é que as células B podem interagir com antígenos livres em solução, enquanto as células T somente reconhecem os antígenos apresentados em associação com glicoproteínas do MHC expressas nas chamadas "células acessórias". As células acessórias possuem como funções processar e apresentar os antígenos para as células T, bem como secretar os fatores de crescimento e diferenciação durante o desenvolvimento da resposta imune. Vários tipos de células podem funcionar como células acessórias incluindo macrófagos, monócitos, células dendríticas, células B, células endoteliais e fibroblastos

Portanto, o funcionamento do sistema imune depende de interações entre várias populações e subpopulações de células linfóides (CLAMAN, 1987) via moléculas de superfície celular e de moléculas solúveis como as citocinas que são liberadas por populações distintas de células imunes.

## **1.1. CITOCINAS NA REGULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE.**

A questão de como as células envolvidas na resposta imune se comunicam entre si tem sido alvo de pesquisa desde 1960, quando foi demonstrado pela primeira vez

que linfócitos poderiam proliferar "in vitro" quando desafiados com mitógenos, antígenos ou células alogênicas. Numerosos estudos que surgiram após esta década demonstraram que sobrenadantes da cultura de linfócitos estimulados com antígenos ou mitógenos apresentavam fatores solúveis que poderiam induzir a proliferação de células T ou B, resultando na diferenciação de células produtoras de anticorpos e ainda poderiam induzir a ativação de células T citotóxicas, macrófagos e outras células inflamatórias. Foi originalmente assumido que a principal fonte desses fatores eram os linfócitos. No entanto, GERY e col. demonstraram em 1972 que os macrófagos poderiam também liberar um fator mitogênico solúvel denominado fator ativador de linfócito (LAF). A caracterização desses mediadores progrediu lentamente nessa época, devido ao fato deles serem produzidos por populações mistas de células linfóides e ainda pelos ensaios usados para detectá-los que eram complexos e na maioria das vezes envolviam populações heterogêneas de células linfóides. Portanto, usando esses ensaios a atividade avaliada poderia ser resultante da ação de mais de um fator ativador. Nesta época então, a caracterização bioquímica desses fatores limitou-se a determinar o peso molecular por cromatografia de filtração bem como o ponto isoelétrico desses mediadores. O termo genérico de linfocina foi adotado para descrever esses fatores e a cada fator foi dado o nome da atividade biológica por ele induzido, de modo que na metade da década de 70 mais de 100 diferentes atividades biológicas tinham sido descritas.

O ponto predominante visto na década de 70 foi que os fatores mitogênicos eram de fato mediadores da resposta proliferativa das células T, e foi considerado que essa resposta proliferativa dependia da presença de antígeno ou mitógeno. Este panorama mudou radicalmente em 1976 quando MORGAN e col. observaram que o sobrenadante da cultura de células mononucleares do sangue periférico humano estimuladas com fitohemaglutinina (PHA) promoviam a proliferação de células T "in vitro" na ausência de antígeno ou mitógeno. Esses achados permitiram o isolamento de clones funcionais de células T. A clonagem de linhagens de células T permitiu o



desenvolvimento de ensaios para determinar as atividades mitogênicas presentes nos sobrenadantes da cultura de linfócitos. Em 1979, no "Second International Lymphokine Workshop", um consenso foi atingido (AARDEN et al., 1979) a respeito da definição de dois fatores que modulavam a ativação de linfócitos, o LAF um fator produzido por macrófago e o fator produzido por linfócito T, estudado por muitos laboratórios e chamados de várias maneiras incluindo fator mitogênico para timócito (TMF), fator de crescimento de célula T (FCCT) e fator auxiliar de célula Killer (KHF). Embora ambos os fatores fossem capazes de estimular a resposta mitogênica de timócitos a PHA, eles podiam ser facilmente diferenciados com base no tipo de célula responsável pela produção, por critérios bioquímicos e mais importante pela capacidade do produto da célula T mas não do LAF, para manter linhagens de célula T "in vitro". Devido a propriedade essencial de ambos os fatores agirem como um sinal de comunicação entre diferentes populações de leucócitos, o termo interleucina (entre leucócitos) foi adotado. O LAF foi designado interleucina-1 (IL-1) e o TSF foi designado interleucina-2 (IL-2).

Nos últimos 10 anos, muitas citocinas têm sido caracterizadas a nível celular e molecular. A sua identificação foi facilitada pelo desenvolvimento de bioensaios que monitoram a atividade de um único fator, pelo isolamento de linhagens de células clonadas que servem como fonte homogênea do fator, pelo uso de anticorpos monoclonais e pela aplicação de procedimentos bioquímicos (ex: cromatografia líquida de alta resolução) para separar os fatores ativos, das proteínas contaminantes. E ainda, a aplicação das técnicas de biologia molecular tem permitido isolar os cDNAs responsáveis pela síntese de cada uma delas, permitindo a produção de citocinas recombinantes que podem ser usados em estudos "in vivo" e "in vitro".

Sabe-se hoje, que as citocinas são proteínas hormonais secretadas durante a resposta imunológica e inflamatória por vários tipos de células, e são responsáveis pela maioria dos sinais intercelulares necessários à integridade da resposta à grande variedade de estímulos externos. Foi demonstrado que as citocinas estão envolvidas na regulação da

hematopoiese e linfopoiese por afetar as funções de todos os tipos de células responsáveis pela resposta imune. Excessiva produção de citocinas como visto nas inflamações crônicas tem consequências patológicas. Cada citocina é frequentemente produzida por mais de um tipo de célula e um padrão diferente de produção de citocinas pode ser induzido por vários estímulos. Adicionalmente, diferentes estímulos podem ativar tipos distintos de células levando à secreção de várias combinações de citocinas. Isto pode resultar em diferentes respostas fisiológicas para cada tipo de estímulo.

As citocinas são mediadores extremamente importantes que interagem com os receptores de superfície celular específicos de alta afinidade e cuja ação geralmente ocorre de maneira autócrina ou parácrina. A produção das citocinas é transitória e os RNAm para algumas dessas citocinas (ex: INF- $\beta$  e IFN- $\gamma$ , GM-CSF e G-CSF) possuem meia vida extremamente curta (< 30 minutos) enquanto que a meia vida de outros RNAm (ex: IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, TNF- $\alpha$ ) é maior (1-2 horas), mas ainda curta se comparadas com a maioria dos RNAm de mamíferos (OPPENHEIM et al., 1991).

Assim, podemos organizar as citocinas em quatro grandes grupos de acordo com suas principais propriedades biológicas.

### **GRUPO 01:**

#### **CITOCINAS MEDIADORAS DA IMUNIDADE NATURAL.**

Esse grupo de citocinas inclui aquelas que estão envolvidas na proteção contra a infecção viral e aquelas que iniciam a resposta inflamatória conferindo proteção contra bactérias e alguns protozoários. Fazem parte desse grupo o IFN  $\alpha$  e  $\beta$ , o TNF- $\alpha$ , a IL-1, IL-6 e as citocinas inflamatórias de baixo peso molecular (ABBAS et al., 1991). Suas propriedades químicas e biológicas estão resumidas na Tabela 1.

TABELA 1 — CITOCINA MEDIADORAS DA IMUNIDADE NATURAL.

CITOCINA	NÚMEROS DE GENES	P.M.(KD)	CÉLULA PRODUTORA	CÉLULA ALVO	EFEITOS PRIMÁRIOS NAS CÉLULAS ALVOS
IFN ( $\alpha$ e $\beta$ )	20 IFN- $\alpha$	18(M)	Macrófago outros tipos celulares	Todas	Anti-viral, aumento da expressão MHC classe-I e anti-proliferativo
	1 IFN- $\beta$	23	Fibroblasto	Nk	Ativação
TNF- $\alpha$	1	17	Macrófago célula T célula B	Neutrófilo	Ativação (inflamação)
				célula Endotelial	Ativação (inflamação, coagulação)
				célula do Hipotálamo	Febre
				Hepatócito	Modulação da produção de proteínas de fase aguda
				células Muscular e gordurosa	Catabolismo (caquexia)
IL-1	2 (IL-1 $\alpha$ e $\beta$ )	17 (M)	Macrófago outros tipos celulares	células T e B	Coestimulador
				célula Endotelial	Ativação (inflamação, coagulação)
				célula do Hipotálamo	Febre
				Hepatócito	Modulação da produção de proteínas de fase aguda
				células Muscular e Gordurosa	Catabolismo (caquexia)
IL-6	1	26 (M)	Macrófago célula T célula Endotelial	células T e B	Coestimulador
				célula B Madura	Proliferação
				Hepatócito	Modulação da produção de proteínas de fase aguda
CITOCINAS INFLAMATORIAS DE BAIXO PESO MOLECULAR	20*	8-10 (M/d)	Macrófago célula T Plaqueta célula Endotelial Fibroblasto	Leucócito	Quimiotaxia e ativação

(M) - monômero

(d) - dímero

\* - 20 genes descritos e outros ainda não relatados

**GRUPO 02:**  
**CITOCINAS REGULADORAS DA ATIVAÇÃO, PROLIFERAÇÃO E**  
**DIFERENCIAÇÃO.**

Desse grupo fazem parte as citocinas produzidas principalmente por linfócitos T ativados por antígeno e que são responsáveis pela regulação dos próprios linfócitos T. As citocinas que possuem essa função são a IL-2, IL-4 e TGF- $\beta$ , cujas atividades estão resumidas na Tabela 2 (ABBAS et al., 1991).

**GRUPO 03:**  
**CITOCINAS ATIVADORAS DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS.**

Nesse grupo estão aquelas citocinas produzidas por células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> após a estimulação antígeno específica e são responsáveis pela ativação das funções de células efetoras não específicas. Portanto essas citocinas, IFN- $\gamma$ , linfotoxinas, IL-5 e MIF são mediadores da fase efetora da imunidade celular. As propriedades gerais dessas citocinas estão resumidas na Tabela 3 (ABBAS et al., 1991).

**GRUPO 04:**  
**CITOCINAS QUE ESTIMULAM A HEMATOPOIESE.**

Várias citocinas produzidas durante a resposta imune possuem um efeito estimulatório na proliferação e diferenciação de células progenitoras da medula óssea. Por conseguinte, as reações inflamatórias e imunes induzem a produção de novos leucócitos.

**TABELA 2** — CITOCINAS MEDIADORAS DA ATIVAÇÃO, PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO.

CITOCINA	NÚMEROS DE GENES	P.M.(KD)	CÉLULA PRODUTORA	CÉLULA ALVO	EFEITOS PRIMÁRIOS NAS CÉLULAS ALVOS
IL-2	1	14-17(m)	célula T	célula T célula NK célula B	Proliferação, produção de citocinas Proliferação, ativação Proliferação, síntese de anticorpo
IL-4	1	20(m)	célula T CD4 <sup>+</sup>	célula T célula B Macrófago	Proliferação Ativação, proliferação, switching (IgG e IgE), expressão de CD23(FcεRIIb) Expressão de CD23
TGF-β	2	14(ho/he)	célula T , macrófago e outras	célula T Macrófago outras	Inibição da ativação e da proliferação Inibição da ativação Regulação da proliferação

(m) - monômero

(ho/he) - homodímero/heterodímero

**TABELA 3 — CITOCINAS MEDIADORAS DA ATIVAÇÃO DE CÉLULAS EFETORAS.**

CITOCINA	NÚMEROS DE GENES	P.M.(KD)	CÉLULA PRODUTORA	CÉLULA ALVO	EFEITOS PRIMÁRIOS NAS CÉLULAS ALVOS
IFN- $\gamma$	1	21-24(ho)	célula T, célula NK	Macrófago célula Endotelial célula NK outras	Ativação Ativação Ativação Aumento de MHC classe-I e classe II
TNF- $\beta$	1	24(ht)	célula T	Neutrófilo célula Endotelial	Ativação Ativação
IL-5	1	20(m)	célula T	Eosinófilo célula B	Ativação Proliferação e ativação
MIF	?	?	célula T	Macrófago	Conversão do estado de mobilidade para imobilidade

(m) - monômero

(ho) - homodímero

(ht) - homotrímero

As citocinas que estimulam a expansão e diferenciação de células progenitoras da medula óssea são coletivamente chamadas de fatores estimuladores de colônias (CSFs) devido a sua capacidade de estimular a formação de colônias de células na cultura de medula óssea. Os nomes que antecedem ao CSFs refletem o tipo de colônia que é produzida, como mostra a Tabela 4 (ABBAS et al., 1991).

Portanto, as citocinas servem como mediadores da informação regulatória, mas como citamos anteriormente, o reconhecimento intercelular é um evento central no desenvolvimento da resposta imune específica e inflamatória. O funcionamento inapropriado das interações celulares pode causar doença. Por exemplo, um defeito na adesão de leucócitos e na adesão de plaquetas pode resultar respectivamente em infecções bacterianas repetitivas e sangramento da mucosa (SHARON & LIS, 1989). Por outro lado, o reconhecimento e interações aberrantes entre células têm como consequências crescimento e mobilidade não controlados que caracterizam as transformações neoplásicas e as metástases (RAZ & LOTON, 1987).

## **1.2. LECTINAS ENDÓGENAS COMO MOLÉCULAS DE RECONHECIMENTO.**

Para o entendimento da base molecular das interações entre as células foi necessário o auxílio de muitas áreas da biologia. Vários dados têm sugerido que esse processo é altamente seletivo e geralmente provido de uma especificidade estereoquímica de complementariedade entre as moléculas. Isto é, deve haver complementariedade entre a molécula que carrega a informação biológica e aquela que é capaz de decodificar a informação. O reconhecimento intercelular é, portanto, outro aspecto do conceito

**TABELA 4 — CITOCINAS MEDIADORAS DA PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE LEUCÓCITOS IMATUROS.**

CITOCINA	NÚMEROS DE GENES	P.M.(KD)	CÉLULA PRODUTORA	CÉLULA ALVO	EFEITOS PRIMÁRIOS NAS CÉLULAS ALVOS
IL-3	1	20-26(m)	célula T	célula progenitora imatura	Proliferação e diferenciação de todas as linhagens celulares
GM-CSF	1	22(m)	célula T Macrófago Fibroblasto célula Endotelial	célula progenitora imatura  célula progenitora comprometida  Macrófago	Proliferação e diferenciação de todas as linhagens celulares  Diferenciação a granulócitos e fagócitos mononucleares  Ativação
M-CSF	1	40(d)	Macrófago Fibroblasto célula Endotelial	célula Progenitora comprometida	Diferenciação a fagócitos mononucleares
G-CSF	1	19(m)	Macrófago Fibroblasto célula endotelial	célula progenitora comprometida	Diferenciação a granulócitos
IL-7	1	25(m)	Fibroblasto células do estroma da medula óssea	célula progenitora imatura	Proliferação e diferenciação a linfócitos B

(m) - monômero

(d) - dímero



fundamental de complementariedade chave fechadura originalmente formulado por EMIL FISCHER (1897)<sup>1</sup> para explicar a interação entre enzimas e substratos. Esta hipótese foi estendida por PAUL EHRLICH (1900)<sup>1</sup> e FRANK LILLIE (1914)<sup>1</sup> para descrever a interação das células com moléculas solúveis e com outras células respectivamente. Na década de 20, a hipótese chave-fechadura tornou-se um conceito teórico central para a biologia celular. A natureza das moléculas envolvidas no reconhecimento celular era ainda um mistério.

A possibilidade de que vários dos eventos envolvidos no reconhecimento celular sejam mediados por carboidratos e lectinas, tem recebido atenção nos últimos 20 anos. As lectinas representam uma classe de proteínas de origem não imune que se ligam de maneira não covalente a carboidratos (LIS & SHARON, 1986).

Nos anos 70 foi estabelecido que a maioria das células apresentam na sua superfície carboidratos na forma de glicoproteínas, glicolípides e polissacarídeos (COOK, 1986). Ao mesmo tempo, foi demonstrado que os carboidratos possuem potencial para codificar informações biológicas (COOK, 1986; SHARON, 1975; SHARON, 1980).

Nos peptídeos e oligonucleotídeos a informação contida é baseada somente no número e sequência de unidades. Nos polissacarídeos no entanto, a informação é também codificada através da posição e configuração anomérica ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) de unidades glicosídicas e ainda na ocorrência de arranjos lineares ou ramificados. Dessa maneira, a partir do mesmo número de monômeros, muito mais estruturas podem ser criadas com carboidratos do que com aminoácidos (SPRINGER & LASKY, 1991). Então teoricamente, um enorme número de componentes podem ser derivados de um número relativamente limitado de monossacarídeos, levantando a hipótese de que a

---

<sup>1</sup>\*FISCHER, E. - EHRLICH, P. - LILLIE, F. apud GILBERT, S.F. & GREENBERG, J.P. - Intellectual traditions in the life sciences. II. stereocomplementarity. *Perspect. Biol. Med.*, **28**:18-34, 1984.

"especificidade" de polímeros naturais seja escrita em termos de resíduos de açúcar e não de aminoácidos ou nucleotídeos (SHARON, 1975).

Várias observações sugerem que a interação lectina-carboidrato possui um importante papel nos mecanismos de reconhecimento celular e de comunicação entre as células do sistema imune. Já é bem conhecido o fato de todas as células do sistema imune apresentarem carboidratos e lectinas de diferentes especificidades em sua superfície. Por exemplo, macrófagos peritoniais apresentam em sua superfície lectinas específicas para  $\beta$ -D-galactose (MUELLER et al., 1983) e para D-manose/N-acetil-D-glucosamina (STAHL et al., 1978). Foi demonstrado que essas lectinas participam da fagocitose (WARR, 1980, STAHL et al., 1984) e da pinocitose (STAHL et al., 1980; SUNG et al., 1983) de patógenos, eritrócitos danificados ou glicoproteínas. A observação de que a fagocitose de células tumorais autólogas, que possuem resíduos de monossacarídeos na superfície (D-manose, N-acetil-D-glucosamina, N-acetil-galactosamina), por macrófagos levando à ativação destes, sugere a participação da interação lectina-carboidrato na ativação de macrófagos (CHATTOPADHYAY & BATTACHARYYA, 1987).

Uma lectina de 45-60 kDa específica para galactosamina/N-acetil-galactosamina (Gal/Gal-NAC) purificada a partir de macrófagos ativados foi descrita por ODA e col. (1989). Neste sentido, verificou-se que essa lectina participa na interação entre as células tumorais e os macrófagos tumorícidias, como por exemplo na interação entre os macrófagos ativados com o tumor OK-432. Estes resultados sugerem que a interação de macrófagos ativados com as células tumorais via lectina específica para Gal/Gal NAC possui um importante papel no mecanismo de morte das células tumorais.

Várias reações imunotóxicas, incluindo a citotoxicidade mediada por células NK e linfócitos T citotóxicos, podem ser inibidas por mono e oligossacarídeos (BRUNDA et al., 1983; KORNBLUTH, 1985), sugerindo, portanto, o papel da interação lectina-carboidrato nesses mecanismos. Foi demonstrado ainda que carboidratos presentes na superfície das células tumorais estão envolvidos predominantemente no seu

reconhecimento e destruição por células NK (STUTMAN et al., 1980; ADES et al., 1981; MacDERMOTT et al., 1981; SMETS & BOLSCHER, 1985) e pelos linfócitos T citotóxicos (PILMOTT & MILLER, 1986).

A atividade de lectina tem sido descrita também para proteínas presentes na membrana de outros tipos de leucócitos. Essas lectinas estariam promovendo a interação adesiva entre leucócitos e o endotélio das vênulas pós-capilares, necessária para a migração direcionada ou "homing" dessas células (STOOLMAN et al., 1984). Exemplo de receptores para carboidratos presentes em superfícies celulares é a recém-descrita família das selectinas, constituídas por três membros, que são: a) as LEC-CAM, que medeiam a interação de leucócitos com o endotélio através de resíduos de ácido siálico; b) as PADGEM (CD 62), presentes em plaquetas e células endoteliais e que promovem a interação dessas com os neutrófilos e os monócitos através do fator Lewis-X (CD 15); e c) ELAM-1, presentes também em plaquetas e endotélio promovendo a interação com neutrófilos através de fator Lewis-X sializado (SPRINGER & LASKY, 1991).

TANAKA e col. (1993), demonstraram que uma proteína inflamatória produzida por monócito  $1\alpha$  (MIP- $1\alpha$ ), possui um sítio ligante para glicosaminoglicana e que essa lectina induz quimiotaxia e adesão de células T. Mais especificamente a MIP- $1\alpha$  aumenta a adesão de células T-CD8<sup>+</sup> à chamada molécula vascular de adesão celular - VCAM-1. Os autores sugerem que a MIP- $1\alpha$  e outras lectinas com sítios ligantes para glicosaminoglicanas ligando à proteoglicanas presentes no endotélio podem estar promovendo uma adesão seletiva de subtipos de linfócitos.

Componentes polissacarídeos de microrganismos patogênicos ou não patogênicos são provavelmente um dos elementos importantes no seu reconhecimento pelas células do sistema imune e podem, portanto, estarem envolvidos nos mecanismos de regulação positiva ou negativa do sistema imune. Como exemplo de polissacarídeos naturais de fungos com função imunorregulatória, podemos citar as  $\beta$ -glucanas presentes nos fungos da espécie *Lentinus edodes* (MAEDA et al., 1974). Entre os vários

mecanismos de atividade imunofarmacológica das glucanas estão o efeito anti-tumoral, a prevenção da carcinogênese (JACQUES, 1982), o aumento da resistência do hospedeiro às infecções bacterianas, virais, parasitárias e aos fungos (CHIHARA, 1983), o aumento da atividade proliferativa e fagocítica dos fagócitos mononucleares e as propriedades adjuvantes (DiLUZIO, 1983; DiLUZIO, 1985). No entanto, muitas dessas propriedades não foram completamente explicadas. Inicialmente, a ligação das glucanas aos seus receptores específicos presentes na superfície de monócitos (CZOP & AUSTEN, 1985a) seguida de ativação celular (CZOP & AUSTEN, 1985b), se constituía numa explicação plausível para estas propriedades. Resultados posteriores no entanto, obtidos de estudos estruturais das glucanas sugerem que o fator essencial necessário para sua atividade anti-tumoral é o ligante  $\beta$ -(1-3)-D-glucosil e o alto peso molecular das glucanas (ADACHI et al., 1989).

O polifrutofuranosídeo solúvel em água (Levana) isolado da bactéria *Aerobacter levanicium*, com peso molecular próximo de  $2 \times 10^4$  kDa é um outro exemplo de polissacarídeo natural imunomodulador. Esse tem mostrado possuir atividade anti-tumoral contra linfoma (AKR), melanoma B16, leucemia MBL2 e carcinoma de Lewis do intestino. A levana combate o tumor por meio do aumento da ação citotóxica direta das células linfóides do hospedeiro, pela capacidade de influenciar as funções das células T e dos macrófagos em vários mecanismos e pela atividade mitogênica T independente sobre as células B (SHEZEN et al., 1978).

Propriedades imunomoduladoras têm sido observadas ainda em vários tipos de mananas. Então, mananas de *Rhodotorula rubra*, composta de cadeia linear de unidades de manopiranosídeo unida por ligações glicosídicas  $\beta$ -(1-3) e  $\beta$ -(1-4) alternadas, com peso molecular aproximado de 65 kDa, altamente solúvel em água, também mostrou atividade anti-tumoral contra sarcoma-37, melanoma e outros tumores experimentais não específicos (ELINOV et al., 1979). Esse polissacarídeo ativou macrófagos "in vitro" mas inibiu sua migração. Também aumentou o nível de várias enzimas proteolíticas e o nível de

células linfóides no plasma sanguíneo. Propriedades imunorreguladoras interessantes e complexas foram demonstradas para mananas isoladas da parede celular do fungo *Candida*-sp. Uma fonte representativa desse polissacarídeo é *Candida albicans* que é um fungo de hábito intracelular (YOUNG et al., 1974). A manana consiste de cadeias laterais de manosil, em que os resíduos de manose estão ligados por ligações  $\alpha$ -(1-6) para formar uma "espinha dorsal" que é altamente substituída por pequenas cadeias de oligomanosídeo contendo maior número de ligações internas do tipo  $\alpha$ -(1-2) e  $\alpha$ -(1-3) (KOGAN et al., 1988). Foi demonstrado que as mananas purificadas modulam negativamente a resposta de células formadoras de anticorpos em vários níveis. A interação de macrófagos com mananas de *Candida*-sp via seus receptores para manose/N-acetyl-D-glucosamina parece estar envolvido no fenômeno clínico supressivo de pacientes com infecções de repetição por *Candida vaginitis* (WITKIN et al., 1986). Experimentos "in vitro" mostraram que os macrófagos desses pacientes inibem a proliferação dos linfócitos de indivíduos normais. Sugeriu-se que o efeito supressivo ocorria através da produção de prostaglandinas por macrófagos, porque a adição de inibidores de prostaglandinas à cultura evita que macrófagos destes pacientes inibam a resposta proliferativa normal (WITKIN et al., 1986). Então, estes resultados sugeriram que mananas de *Candida*-sp têm potencial para influenciar múltiplas funções biológicas "in vivo" e "in vitro" (DOMER, 1989). Recentemente evidenciou-se as propriedades imunossupressivas dos membros da família de oligômeros derivados de mananas de *Candida*-sp, que em maior intensidade que a própria manana, suprimem a função imune mediada por células T em pacientes com infecções crônicas por *Candida albicans* (PODZORSKI et al., 1990).

Portanto, a ocorrência de polissacarídeos naturais pode ser um importante agente imunorregulador. Dependendo da estrutura em questão os polissacarídeos podem estimular ou inibir a resposta imune por meio de vários mecanismos incompletamente entendidos. As lectinas presentes na superfície de células imunes são provavelmente essenciais na mediação de sinais reguladores da resposta imune.

As lectinas solúveis com propriedades reguladoras são também encontradas em vertebrados. Muitos tecidos de vertebrados contêm lectinas solúveis ligantes de galactose (BARONDES, 1984; BARONDES et al., 1988; DRICKAMER, 1988). Lectinas desse tipo são reguladoras do desenvolvimento e são expressas em diferentes estágios de diferenciação de vários tecidos. São encontradas no citoplasma da célula ou na matriz extracelular, dependendo do tecido e do estágio de desenvolvimento tissular (BARONDES et al., 1988). Esse grupo de proteínas pode, por exemplo, estar envolvido no processo de desenvolvimento embrionário dos tecidos. Recentemente, uma proteína solúvel ligante de  $\beta$ -galactosídeo, foi descrita como sendo um fator autócrino, supressor de crescimento celular. Fibroblastos de embriões de camundongo liberam esse fator que então inibe reversivelmente a proliferação celular (WELLS & MALLUCCI, 1991). Um outro grupo de lectinas solúveis de vertebrados possui especificidade para heparina (CARON et al., 1986) e provavelmente age como um fator regulador específico da proliferação de tecidos na fase embrionária (MACIAG et al., 1984). Um grupo de lectinas solúveis específicas para manose foi descrito por EZEKOWITZ & STAHL (1988) e parece possuir nítida propriedade imunorregulatória. Essas proteínas ligantes de manose são sintetizadas pelo fígado como parte da resposta imune de fase aguda, e sua síntese "in vitro" parece ser regulada positivamente por citocinas (KUHLMAN et al., 1989). A interação de patógenos contendo grande quantidade de resíduos de manose resulta na opsonização e morte destes por fagocitose (KUHLMAN et al., 1989). O efeito bactericida é dependente da concentração da lectina e do complemento (KAWASKI et al., 1989).

Um achado surpreendente sobre a participação na imunorregulação de lectina endógena específica para manose foi descrita por MUCHMORE & DECKER (1987). Estes autores observaram que a IL-1 $\alpha$  exibe atividade tipo lectina associando-se através de ligações N-glicosídicas a uma glicoproteína homogênea isolada da urina humana, denominada uromodulina. Também foi demonstrada a interação tipo lectina do

TNF recombinante (SHERBLOM et al., 1988) e da IL-2 (SHERBLOM et al., 1989) com a mesma uromodulina. Com a identificação do sítio glicosídico da uromodulina os autores concluíram que os resíduos de oligomanosídeos com estruturas definidas são os responsáveis pela ligação específica das linfocinas, através de sítios com atividade de lectinas. No entanto, verificaram que o sítio com atividade de lectina da IL-2 é distinto do sítio ligante ao receptor para IL-2. Foi então proposto que a especificidade para IL-2 não é um achado acidental, mas sim que este fato possui um papel crítico na remoção desta interleucina ("clearance") e na regulação de sua atividade biológica (SHERBLOM et al., 1989). Essas observações abrem uma nova perspectiva para a importância do reconhecimento entre lectinas e carboidratos na regulação da resposta imune em humanos.

## **2. LECTINAS DE PLANTAS COMO FERRAMENTAS NO ESTUDO DA IMUNORREGULAÇÃO.**

Vários métodos, incluindo a inibição de biossíntese de carboidratos por moléculas de baixo peso molecular (DATEMA et al., 1987; ELBEIN, 1987), deglicosilação por endoglicosidases (MALEY et al., 1989; SCHWARZ & DATEMA, 1982) ou hidrólise (WELPLY, 1989), são frequentemente usados para o estudo do papel de carboidratos de superfície na imunorregulação. No entanto, as primeiras observações sobre as funções dos carboidratos na resposta imune foram obtidas com o uso de lectinas de plantas (Tabela 5). Está bem documentado que as lectinas Concanavalina-A (Con-A) e fitohemaglutinina (PHA) apresentam atividade mitogênica em linfócitos (REICHERT et al., 1973). As lectinas podem ser classificadas como mitogênicas ou não mitogênicas, baseado na sua capacidade em aumentar a síntese de DNA e de induzir transformação

**TABELA 5** — CARACTERÍSTICAS DE LECTINAS LIGANTES DE CARBOIDRATOS DE SUPERFÍCIE DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE.

NOME	FONTE	ESPECIFICIDADE
Lectina <i>Agaricus bisporus</i> (ABL)	<u>Agaricus bisporus</u>	Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GalNac $\rightarrow$ GalNac
Concanavalina-A (ConA)	<u>Canavalia ensiformes</u>	Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ ligado $\rightarrow$ Glc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ ligado GlcNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ ligado
Jacalina	<u>Arthocarpus integrifolia</u>	$\beta$ - galactosídeos
Artocarpina	<u>Arthocarpus integrifolia</u>	D - manosídeos
Lectina Mistletoe (ML)	<u>Viscum album</u>	Mistura de três lectinas com especificidade para carboidratos contendo $\beta$ - galactose
Aglutinina <i>peanut</i> (PNA)	<u>Arachis hypoagea</u>	Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ GalNac $\gg$ Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4 GlcNAc(N-acetylactosamina) $\rightarrow$ Gal e Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GlcNAc
Fitoemaglutinina (PHA)	<u>Phaseolus vulgaris</u>	Maior especificidade a estruturas complexas contendo GlcNAc $\beta$ 1
Mitogeno Pokweed (PWM)	<u>Phytolaca americana</u>	Complexo de cadeias poly (Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc); (GlcNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4) unidades ou Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 5 $\rightarrow$ 2Man $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3Man $\beta$ 1 $\rightarrow$ GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc $\rightarrow$ AsnH
Aglutinina da Soja (SBA)	<u>Glycine maxinus</u>	GalNAc $\alpha$ ou $\beta$ -ligado, GalNAc $\alpha$ $\rightarrow$ 3 Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GlcNAc e GalNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3Gal $\gg$ GalNAc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6RA, Gal $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6Glc(melibiose), Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6Glc, rafinose, stachyose, Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc (lactose) e $\rightarrow$ Fuc $\alpha$ 1 - 2Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 6R $\gg$ Gal
Aglutinina do Germe de Trigo (WGA)	<u>Triticum vulgare</u>	(GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4) $_5$ $\rightarrow$ (GlcNAc $\beta$ 1) $_4$ e (GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4) $_3$ $\rightarrow$ GlcNac

As especificidades das lectinas são apresentadas de acordo com Guide of Lectin Specificities (Wu et al., 1987). Especificidade da Jacalina esta de acordo com Dalmay & Freitas (1989), a especificidade da Mistletoe está de acordo com Luther e cols. (1980), e a especificidade da Artocarpina está de acordo com Miranda-Santos e cols. (1991b).



blástica de populações específicas de linfócitos. Con-A assim como PHA são mitógenos seletivos para célula T e parecem ligar-se ao TCR dessas células (KANELLOPOULOS et al., 1985), embora outras glicoproteínas da mesma célula também estariam sendo estimuladas. Em contraste com a Con-A, a aglutinina extraída do germe de trigo (WGA) produz um sinal negativo na ativação de linfócitos (GREENE et al., 1976) que resulta na inibição de proliferação dessas células (GREENE & WALCHMANN, 1980). A ativação de linfócitos por lectinas mitogênicas é comparável à ativação antigênica, com consequente modificações morfológicas, modulação fenotípica de determinantes de superfície e liberação de linfocinas e imunoglobulinas (WHISLER & YATES, 1980). Em contraste com a ativação antigênica, a estimulação induzida pela lectina leva à ativação policlonal das células que possuem as glicoproteínas de superfície específicas para a lectina (WHISLER & YATES, 1980; MILLER et al., 1982). As lectinas mitogênicas, bem como, as não mitogênicas ligam-se a glicoproteínas de superfície celular e provocam o "patching", "capping" e a endocitose do complexo lectina-glicoconjugado (CONE, 1977). Como no caso da estimulação antigênica dos linfócitos, a ativação mediada por lectina parece ser dependente da presença de células acessórias (ROSENSTREICH et al., 1976; KIMURA & ERSSON, 1981). Outras investigações têm mostrado ainda que as lectinas de planta, como a Con-A, a WGA e a PHA inibem a citotoxicidade de células T do sangue periférico humano, e de clones de linfócitos T citotóxicos, por meio da modulação de estruturas de superfície celular presentes na célula alvo que estão envolvidas na citólise (SITKOVSKY et al., 1984; TORIBIO et al., 1985).

Uma outra lectina de planta bastante estudada é o mitógeno pokeweed (PWM), isolado de *Phytolacca americana* que possui diferentes propriedades imunoestimuladoras. Foi demonstrado que o PWM estimula a produção de imunoglobulinas por células B, e que esta produção é regulada por células T auxiliares e supressoras (KINA et al., 1982). Esses dados sugerem que a ativação induzida pelo PWM é dependente de linfocinas secretadas pelas células T auxiliares CD4<sup>+</sup>. Um outro forte

ativador policlonal de células B com grande atividade mitogênica para célula T é a lectina Jacalina isolada da semente da jaca de *A. integrifolia* (BUNN-MORENO & CAMPOS-NETO, 1981).

Portanto, os resultados obtidos com lectinas de plantas, como ferramenta experimental, indicam que a imunorregulação é mediada por carboidratos através da estimulação de células imunes específicas e posterior secreção de citocinas. Ou ainda, através de modificações direta de moléculas de superfície celular na célula alvo imune, com consequência secundária nas interações célula-célula. A sinalização intracelular, depois do evento da ligação lectina-carboidrato, a partir da membrana da célula imune até o nível gênico e vice-versa é provavelmente mediado por um mensageiro comum.

### **3. O EXTRATO BRUTO DE *A. integrifolia* E SEU PAPEL NO ESTUDO DA INTERAÇÃO LECTINA-CARBOIDRATO.**

Os estudos iniciais com uma lectina extraída de sementes de *A. integrifolia* visavam o seu emprego como elemento discriminador de formas de crescimento de *Trypanosoma cruzi* (PEREIRA et al., 1980) e como substância ativadora de linfócitos humanos (BUNN-MORENO & CAMPOS-NETO, 1981). Foi mostrado independentemente por dois autores (PEREIRA et al., 1980; SURESHKUMAR et al., 1982) que a especificidade glicídica dessa lectina era a D-galactose e seus derivados. Em seguida, essa lectina foi purificada e caracterizada por dois grupos que determinaram cromatograficamente seu peso molecular como sendo 43 kDa (MOREIRA & AINOUEZ, 1981) ou 39,5 kDa (SURESHKUMAR et al., 1982). A eletroforese em SDS-PAGE revelou uma banda, a Jacalina, correspondente a 10,5 kDa, sugerindo que esta lectina seria

um tetrâmero (APPUKUTTAN & BASU, 1985a). Sua cromatografia em sepharose-Con-A revelou ser ela uma glicoproteína (SURESHKUMAR et al., 1982). APPUKUTTAN & BASU (1985a) verificaram que esse tetrâmero tem apenas dois sítios de ligação glicídica. Esses mesmos autores demonstraram que os resíduos de tirosina e lisina fazem parte do sítio de ligação dessa lectina (APPUKUTTAN & BASU, 1985b). Após a observação original de que a Jacalina era um ligante de IgA humana através de resíduos terminais de D-galactose (ROQUE-BARREIRA & CAMPOS-NETO, 1985), numerosos estudos surgiram empregando essa lectina para a purificação dessa imunoglobulina (KONDOH et al., 1987; AUCOUTURIER et al., 1988). KONDOH e col. (1986) verificaram que a Jacalina era ligante da subclasse de IgA1 humana e outros autores confirmaram e estenderam esses estudos ao demonstrarem que a IgD era também ligante dessa lectina (AUCOUTURIER et al., 1987; ZHER & LITWIN, 1987). Verificou-se também que a Jacalina não é capaz de ligar-se à IgA de porco, cabra, cavalo, boi, cão (WILKINSON & NEVILLE, 1988), camundongo ou rato (SKEA et al., 1988). ROQUE - BARREIRA e col. (1986) purificaram a Jacalina do extrato salino da semente de *A. integrifolia* por cromatografia de afinidade, empregando a coluna Sepharose-IgA. A análise imunoquímica da Jacalina assim purificada teve o seu peso molecular determinado, por gel filtração, como sendo de 43 kDa. Já o SDS-PAGE revelou a presença de duas bandas com peso molecular de 11,8 e 14,7 kDa, indicando que a molécula Jacalina consiste de 3-4 subunidades não idênticas de polipeptídeos (ROQUE-BARREIRA et al., 1986). Posteriormente, a Jacalina foi submetida a estudos cristalográficos preliminares (BASU et al., 1988) e teve a especificidade fina do seu sítio glicídico (SASTRY et al., 1986; MAHANTA et al., 1990) e sequência de aminoácidos (YOUNG et al., 1991) determinadas. A cristalografia confirmou a configuração tetramérica com 39500 Mr e as análises de ligação de sacarídeos revelaram o reconhecimento específico da estrutura ( $\beta$ -D-gal(1-3) Dgal NAc).

A lectina Jacalina é formada por duas cadeias, uma subunidade  $\beta$  de 20 resíduos de aminoácidos e uma subunidade- $\alpha$  de 133 resíduos de aminoácidos (YOUNG et al., 1991). Uma análise mais detalhada revelou que tanto a subunidade  $\alpha$  como a  $\beta$  possuem variações nas cadeias, indicando a existência de múltiplas isoformas de Jacalina (YOUNG et al., 1991). A existência de várias isolectinas na semente de *A. integrifolia* foi confirmada por YANG & CZAPLA (1993) que isolaram e caracterizaram 4 clones de cDNA da semente dessa fruta, que codificam diferentes isoformas da lectina Jacalina.

A demonstração inicial de que o Extrato Bruto de sementes de jaca apresentava forte atividade mitogênica para células T humanas e era um forte ativador policlonal de células B humanas (BUNN-MORENO & CAMPOS-NETO, 1981; BUNN-MORENO, 1986), despertou bastante interesse e iniciou-se um aprofundamento no estudo de suas atividades biológicas. Verificou-se que a Jacalina era um indutor do INF-gama e de fatores de crescimento para células T (CRANE et al., 1984; DALMAU et al., 1989) de modo comparável ao que se obtém com a Con-A.

Foi demonstrado recentemente que a jacalina inibe a infecção "in vitro" do HIV-1 em células linfóides. O efeito anti-HIV-1 da Jacalina ocorre provavelmente através da ligação desta lectina à molécula CD4 impedindo a ligação da glicoproteína viral gp 120 (FAVERO et al., 1993).

Desde a sua descrição como ligante de D-galactose e IgA, a Jacalina tem sido largamente empregada na biologia de modo geral. Por exemplo, a Jacalina tem sido usada para estudar a função de galactosiltransferases de IgA do leite e do soro (McGUIRE et al., 1989). Foi demonstrado que a IgA encontrada em depósitos renais na nefropatia por IgA apresenta glicosilação anormal, estado este avaliado através de sua menor ligação a Jacalina do que os controles normais (ANDRE et al., 1990). A Jacalina também foi empregada para purificar os complexos imunes compostos por anticorpos da classe IgA anti-lactato desidrogenase (BACKER & HARFF, 1989) e para purificar os fragmentos do fator V $\alpha$  da coagulação (HORTIN, 1990). No campo da embriologia, a

Jacalina tem sido usada para identificar glicoproteínas de tecidos neuronais em diferenciação (DAVIES et al., 1990).

Durante o emprego de Jacalina purificada por cromatografia de afinidade em coluna de D-galactose-agarose, foi observado que esta lectina passava a exercer atividade apenas modesta sobre células T e B (MIRANDA-SANTOS et al. 1991a). Estudos bioquímicos e biológicos do extrato salino da semente de *A. integrifolia* revelaram que este extrato apresentava duas lectinas distintas; a Jacalina, lectina ligante de D-galactose e outra lectina, ligante de D-manose denominada Artocarpina. A Artocarpina é responsável pela atividade mitogênica sobre células T humanas e células esplênicas murinas e também induz a ativação policlonal de células B humanas e murinas. A Jacalina é ligante de IgA e inibe a proliferação celular induzida pela Con-A (MIRANDA-SANTOS et al., 1991a e b).

## II. OBJETIVOS

Visto que as lectinas Jacalina e Artocarpina apresentam atividades biológicas de mitogenicidade e especificidades glicídicas distintas este trabalho tem por objetivos:

- Avaliar a produção de citocinas reguladoras da ativação, proliferação e diferenciação dos linfócitos T, como a IL-2, a IL-4 e o TGF- $\beta$ , por células esplênicas murinas quando estimuladas com a fração Artocarpina (F. Arto) ou com a Jacalina.
- Avaliar a produção de citocinas ativadoras de células inflamatórias como o INF-gama e o TNF, por células esplênicas murinas quando estimuladas com a F. Arto ou com a Jacalina.
- Avaliar a produção de citocinas mediadoras da imunidade natural como a IL-6 e o TNF, por células esplênicas murinas quando estimuladas com F. Arto ou com a Jacalina.
- Avaliar a produção de citocina estimuladora da expansão e diferenciação de células progenitoras da medula óssea como a IL-3/GM-CSF por células esplênicas murinas quando estimuladas com a F. Arto ou com a Jacalina.
- Relacionar a especificidade glicídica das lectinas F. Arto e Jacalina com a produção de citocinas específicas.
- Relacionar a produção de distintas citocinas com a atividade mitogênica ou inibitória das lectinas F. Arto e Jacalina respectivamente.
- Relacionar a produção de distintas citocinas com a consequente iniciação de respostas biológicas específicas.

### **III - MATERIAIS E MÉTODOS**



## 1. ANIMAIS.

Os camundongos C3H/HeJ e BALB/c empregados neste estudo foram criados no biotério do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP e foram também gentilmente doados pelo Prof. Humberto de Araujo Rangel, UNICAMP. Os camundongos foram usados com idade entre 2 a 3 meses.

## 2. MITÓGENOS E LECTINAS.

O extrato bruto (E.B.) foi extraído de sementes de *A. integrifolia* como previamente descrito (BUNN-MORENO & CAMPOS NETO, 1981). Em seguida, foi submetido a cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose-D-Galactose (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA). O efluente da coluna foi monitorado para a quantidade de proteína coletada, concentrado e dialisado contra solução salina. A proteína obtida do E.B. neste estágio foi denominada Fração Artocarpina (F. Arto), e possui especificidade glicídica para D-manose (MIRANDA-SANTOS, et al., 1991 a e b). A fração ligante de D-galactose denominada Jacalina foi então eluída com solução de NaCl 0.15M contendo 0.4M de D-galactose (Merck S.A. Rio de Janeiro-R.J.) concentrada e dialisada contra solução salina. A concentração da proteína do E.B. e suas frações foram determinadas pelo método de LOWRY e col. (1951).

Outros mitógenos empregados neste estudo foram a Concanavalina A (Con-A, Sigma Chemical Co., St. Louis, M.O.-USA) e o Lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS, Difco Lab., Detroit Michigan-USA).

### **3. MEIO DE CULTURA COMPLETO.**

Os meios de cultura utilizados nos ensaios biológicos e na manutenção das linhagens de células foram os seguintes: RPMI-1640 ou Dulbecco's (Sigma Chemical Co., St. Louis, M.O.-USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP-Brasil), 200 mM de L-glutamina,  $5 \times 10^{-5}$  M de 2-Mercaptoetanol, 10 µg/ml de ciprofloxacina (Bayer do Brasil S.A., São Paulo, S.P.-Brasil).

A solução salina tamponada (BSS) adicionada de 10 µg/ml de Sulfato de Gentamicina (Shering-Plough LTDA, RIO de Janeiro, R.J.-Brasil) foi usada para lavar as células esplênicas e as linhagens celulares.

### **4. ANTICORPOS MONOCLONAIS.**

Os anticorpos monoclonais usados, anti IL-2 (S4B6), IL-4 (11B11) foram gentilmente doados pelo Dr. Robert Coffman do DNAX Research Institute (Palo Alto, C.A.-USA). Anticorpo monoclonal anti-interferon-gama (XMG1.2) foi doado pelo Dr. Steven Reed do Seattle Biomedical Research Institute (Seattle, W.A.-USA). E o anticorpo policlonal anti-interferon-gama, produzido em coelhos, foi gentilmente cedido pelo Dr. Kenneth Grabstein, Immunex Corporation (Seattle, W.A.-USA).

### **5. ATIVIDADE MITOGÊNICA DAS DIFERENTES LECTINAS CONTIDAS NO EXTRATO BRUTO (E.B.) DE SEMENTES DE *A. integrifolia*.**

As células esplênicas de camundongos foram coletadas e submetidas a centrifugação em Ficoll-Hypaque. A suspensão de células mononucleares foi lavada 3

vezes com BSS e cultivada em placa de 96 poços a uma concentração de  $5 \times 10^5$  cel/poço. As culturas foram incubadas por um período de 72 horas com diferentes lectinas. As concentrações do E.B., F. Arto e Jacalina variaram de 2,5 a 80  $\mu\text{g/ml}$ . A dose de Con-A usada variou de 1.25 a 10  $\mu\text{g/ml}$ . As culturas foram pulsadas com 0.5  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -Timidina 6 a 18 horas antes de seu término e coletadas com um coletor PHD-Cell Harvester. A incorporação de  $^3\text{H}$  Timidina foi avaliada em contador de cintilação líquida (LBK-Mod. 1218).

## **6. PREPARO DE MEIOS CONDICIONADOS (M.C.).**

Suspensão de células mononucleares esplênicas obtida como descrito anteriormente, foi cultivada em placas de vinte e quatro poços (Corning, N.Y.-USA), numa concentração de  $5 \times 10^6$  células/poço, ou em frascos para cultivo celular de 50 ml (Corning N.Y.-USA), numa densidade de  $25 \times 10^6$  células em 5ml de RPMI-completo. As culturas foram estimuladas com 20  $\mu\text{g/ml}$  de E.B. (Meio Condicionado-E.B.), 40  $\mu\text{g/ml}$  de F. Arto (Meio Condicionado-F. Arto), 20  $\mu\text{g/ml}$  de Jacalina (Meio Condicionado-Jacalina), 5  $\mu\text{g/ml}$  de Con-A (Meio Condicionado-Con-A) ou com 5  $\mu\text{g/ml}$  de LPS (Meio Condicionado-LPS). Após incubação por 48 horas a  $37^\circ\text{C}$  em estufa contendo 5%  $\text{CO}_2$ , os sobrenadantes das culturas foram coletados por centrifugação e genericamente denominados de Meio Condicionado-teste (M.C.-teste). A presença de diferentes citocinas nesses M.C.-testes foi avaliada como descrito nos itens de 7 a 12.

Com a finalidade de determinar a secreção de citocinas produzidas especificamente por macrófagos ou linfócitos isto é, monocinas ou linfocinas, foram avaliados os meios condicionados derivados da cultura de populações celulares esplênicas aderentes (macrófagos) e não aderentes (linfócitos) estimuladas com as lectinas. As células aderentes foram obtidas a partir de células esplênicas totais ( $5 \times 10^6$  cel/ml) a após

incubação por 2 horas em placa de cultura de 24 poços, em estufa a 37°C contendo 5% CO<sub>2</sub>. As células não aderentes foram a seguir passadas em coluna de Sephadex G10 conforme preconizado por LY & MISHELL (1974), lavadas duas vezes com BSS e ressuspensas para 1.5x10<sup>6</sup> cel/ml em RPMI-1% SFB. Esta suspensão foi denominada populações celulares não aderentes. Meios condicionados usando as duas populações foram obtidos como descrito para células mononucleares esplênicas.

## 7. DOSAGEM DO FATOR DE CRESCIMENTO PARA CÉLULAS T (FCCT).

A presença de Fator de Crescimento para Célula T (FCCT) nos M.C.-testes foi avaliada através de ensaio biológico usando a linhagem celular CTLL de acordo com método descrito por GILLIS & SMITH (1977). Uma suspensão celular contendo 1x10<sup>5</sup> cel/ml foi distribuída em placa de 96 poços (100 µl/poço) na presença de 100 µl do M.C.-teste. Após 24 horas de cultivo em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, 0.5 µCi de <sup>3</sup>H-Timidina (New England Nuclear) foi adicionado. A cultura foi então incubada por mais 12 horas, coletada e a incorporação de <sup>3</sup>H-Timidina determinada em contador de cintilação líquida (RACKBETA LBK-1218).

A contribuição específica da IL-2 ou IL-4 nos M.C.-testes foi avaliada de acordo com o método de FERNADEZ-BOTRAN e col. (1986), com pequenas modificações. Suscintamente, 100 µl de uma suspensão celular contendo 1x10<sup>4</sup> células HT-2/ml foi distribuída em placas de 96 poços e a seguir 50 µl de cada M.C.-teste foi adicionado em triplicata. Estes M.C.-testes foram cultivados na presença ou ausência de anticorpo anti-IL-2 (S4B6-5 µg/ml) ou anti-IL-4 (11B11-5 µg/ml) por 36 horas em estufa a 37°C contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Nas últimas 12 horas de cultivo foi adicionado 0,5 µCi de <sup>3</sup>H-Timidina (New England Nuclear), a cultura coletada e a incorporação de <sup>3</sup>H-Timidina avaliada em contador de cintilação líquida (RACKBETA LBK-1218).

## 8. DOSAGEM DE IL-3 /GM-CSF.

A presença de IL-3/GM-CSF foi medida pelo ensaio colorimétrico de MTT empregando a linhagem FDCP-1 (Le GROS et al., 1985) como células indicadoras. Em 100  $\mu$ l de meio RPMI suplementado,  $10^5$  células indicadoras foram cultivadas com 20  $\mu$ l do M.C.-teste. Após 48 horas de incubação, a formação de formazan foi medida de acordo com o método descrito por MOSMANN (1983). A D.O. da cultura foi determinada em leitor de ELISA com filtro de 580 nm.

A porcentagem de aumento de secreção de IL-3/GM-CSF por células esplênicas estimuladas com as lectinas F. Arto, Jacalina e Con-A foi determinada. Esta foi calculada comparando, a D.O. obtida quando a linhagem FDCP-1 foi incubada com o meio condicionado de cultura não estimulada com lectinas, com aquela D.O. obtida quando a mesma linhagem indicadora foi incubada com o meio condicionado de cultura estimulada com as lectinas F. Arto, Jacalina e Con-A.

## 9. DOSAGEM DE TNF.

Para avaliar a presença de TNF nos M.C.-testes, foi utilizada a linhagem de célula WEHI-164 clone 13, que é altamente sensível ao fator de necrose tumoral, baseado na técnica descrita por ESPEVIK & NISSEN-MEYER (1986) com pequenas modificações. Uma suspensão contendo  $1 \times 10^5$  cel/ml foi incubada por 18 horas a 37° C, em placa de 96 poços (100  $\mu$ l/poço) na presença de 50  $\mu$ l do M.C.-teste. Posteriormente, foi adicionado 0.5  $\mu$ Ci de  $^3$ H-Timidina (New England Nuclear) e a cultura incubada por mais 4 horas. Após breve congelamento, para que as células se desprendessem dos poços,

as culturas foram coletadas e a incorporação de  $^3\text{H}$ -Timidina avaliada em contador de cintilação líquida (RACKBETA LBK-mod.1218).

A concentração de TNF (U/ml) presente nos M.C.-testes foi determinada a partir da curva padrão utilizando-se TNF humano recombinante, em concentrações que variaram de 5  $\mu\text{g/ml}$  a 0.5 ng/ml. Uma unidade de TNF foi definida como sendo a concentração que induz morte de 50% das células WEHI-164 clone 13.

## 10. DOSAGEM DE IL-6.

A atividade de IL-6 nos meios condicionados foi determinada pelo crescimento da célula B-9, plasmocitoma dependente de IL-6, como descrito por AARDEN e col. (1987). Uma suspensão de  $5 \times 10^4$  cel/ml foi incubada em placas de 96 poços (100  $\mu\text{l}$ /poço), na presença de 50  $\mu\text{l}$  do M.C.-teste, por 72 horas. Nas últimas 6-18 horas de cultivo foi adicionado 0.5  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -Timidina. No final desse intervalo, a cultura foi então coletada e a incorporação de  $^3\text{H}$ -Timidina avaliada em contador de cintilação líquida (RACKBETA LBK-mod.1218).

A concentração (U/ml) de IL-6 presente nos M.C.-testes foi determinada a partir de curva padrão utilizando-se IL-6 murina recombinante. A curva padrão foi obtida utilizando-se sete diluições seriadas 1/2 (V/V), numa concentração inicial de 300 U/ml.

## 11. DOSAGEM DE TGF- $\beta$ .

A presença de TGF- $\beta$  biologicamente ativo nos meios condicionados foi determinada por ensaio biológico utilizando-se células CCL-64 (RANCHALIS et al., 1987). Uma suspensão de  $1 \times 10^5$  cel/ml foi distribuída em placas de 96 poços fundo chato

num volume de 100  $\mu$ l/poço e foi incubada em estufa de CO<sub>2</sub> por duas horas. A seguir, 50  $\mu$ l dos M.C.-testes foram adicionados às culturas em triplicatas, seguido de incubação por mais 24 horas. Cada poço recebeu 0.5  $\mu$ Ci de <sup>3</sup>H-Timidina (New England Nuclear) 4-6 horas antes do término da incubação. Após breve congelamento para que as células se desprendessem dos poços as culturas foram coletadas e as leituras realizadas em contador de cintilação líquida (RACKBETA LBK-mod.1218).

A concentração de TGF- $\beta$  (pg/ml) presente nos M.C.-testes foi determinada a partir de curva padrão, utilizando-se TGF- $\beta$  humano recombinante em concentrações que variram de 10 ng/ml a 0.001 pg/ml.

## 12. DOSAGEM DE IFN- $\gamma$ .

A presença do interferon-gama nos M.C.-testes foi determinado por ELISA.

O anticorco monoclonal XMG1.2 foi diluído em PBS a uma concentração de 10  $\mu$ g/ml. Foram colocados 100  $\mu$ l/poço dessa solução em placa de 96 poços para ELISA (Corning,N.Y.-USA) e a placa incubada durante a noite a 4°C. Após a solução anterior ter sido retirada, as placas foram incubadas com leite em pó desnatado a 5% em PBS (100  $\mu$ l/poço) por um período de 1 hora. Essa solução foi então retirada e a placa lavada 6 vezes com PBS-Tween-20 a 0.05%. A seguir os M.C.-testes (100  $\mu$ l/poço) diluídos em PBS contendo 10% de soro de cabra normal foram adicionados e incubados por duas horas a 37°C. Após este período, a placa foi novamente lavada 6 vezes com PBS-Tween-20 a 0.05% e o segundo ligante, diluído em PBS contendo 10% de soro de cabra, foi adicionado (100  $\mu$ l/poço) e incubado por uma hora. As placas foram então lavadas e o soro de cabra anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina (0.4  $\mu$ g/ml - Fisher Scientific, Pittsburg-PA), foi adicionado. Após a incubação por uma hora a placa foi

lavada 6 vezes com PBS-Tween-20 a 0.05%. Então, 100 µl de uma solução contendo o substrato p-nitrofenilfosfato (1 mg/ml) diluído em tampão dietanolamina (Bio Rad Lab., Regatta Boulevard, Richmond, C.A.-USA) foi adicionado e a leitura realizada em leitor de ELISA, utilizando um filtro de 405 nm.

A concentração (ng/ml) de IFN- $\gamma$  nos M.C.-testes foi determinada a partir da curva padrão utilizando-se IFN- $\gamma$  murino recombinante. Esta curva padrão foi obtida fazendo-se nove diluições seriadas 1/2 (V/V), com uma concentração inicial de 10 ng/ml de IFN- $\gamma$  murino recombinante.

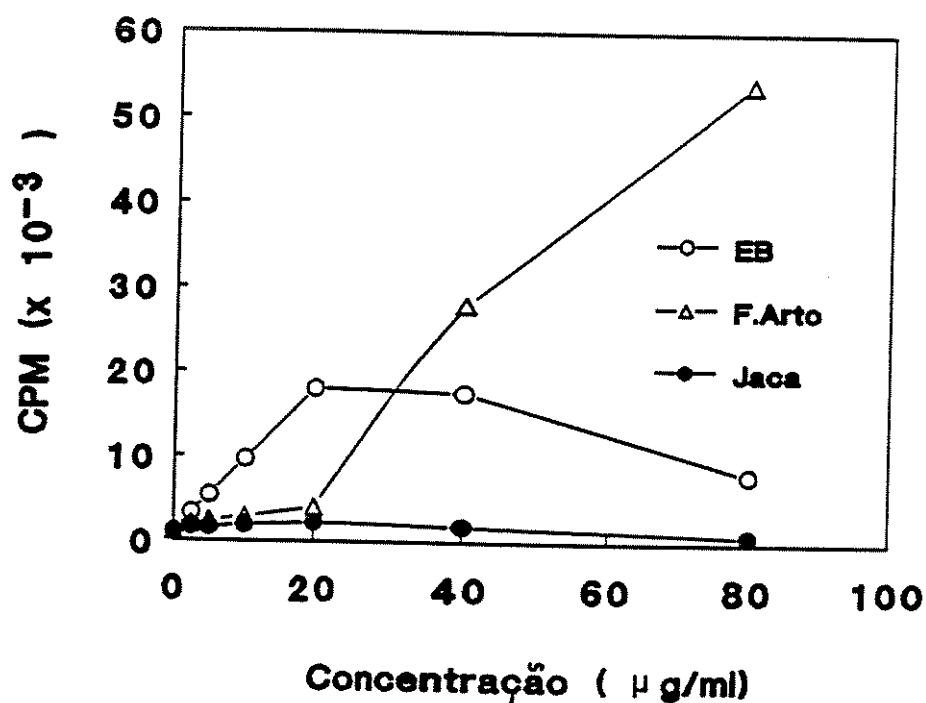




# 1. RESPOSTA PROLIFERATIVA DE CÉLULAS ESPLÊNICAS MURINAS ÀS LECTINAS PURIFICADAS DO E.B. DE SEMENTES DE *Artocarpus integrifolia*

Foi demonstrado previamente que o extrato bruto da semente de *A. integrifolia* contém um mitógeno que é um potente e seletivo estimulador para distintas funções de células T e B. Células mononucleares e células T do sangue periférico humano são induzidas a proliferar pelo extrato bruto, enquanto que células B não proliferam, mas são ativadas policlonalmente para secretarem imunoglobulinas (BUNN-MORENO & CAMPOS-NETO, 1981). A caracterização imunoquímica do E.B. (ROQUE-BARREIRA et al., 1986) revelou que esse continha pelo menos cinco frações. Essas frações foram estudadas para revelar quais continham as atividades biológicas descritas. MIRANDA-SANTOS e col. (1991 a e b), demonstraram que o extrato bruto obtido da semente de *A. integrifolia* possui duas lectinas distintas com diferentes atividades biológicas para linfócitos. Uma é a lectina Jacalina, ligante de D-galactose e a outra é a lectina Artocarpina com especificidade glicídica para D-manose.

A capacidade das lectinas contidas no E.B. da semente de *A. integrifolia* para induzir mitose é mostrada na Figura 1. A F. Arto mostrou ser um potente mitógeno para células esplênicas murinas e a concentração ótima para estimulação foi de 80 µg/ml. A atividade mitogênica dessa lectina purificada foi pelo menos duas vezes superior àquela obtida pelo E.B.. Em contraste, a lectina Jacalina não apresentou qualquer efeito mitogênico para estas células nas concentrações empregadas.



**Figura 1. Atividade mitogênica de lectinas presentes nas sementes de *A. integrifolia*.**

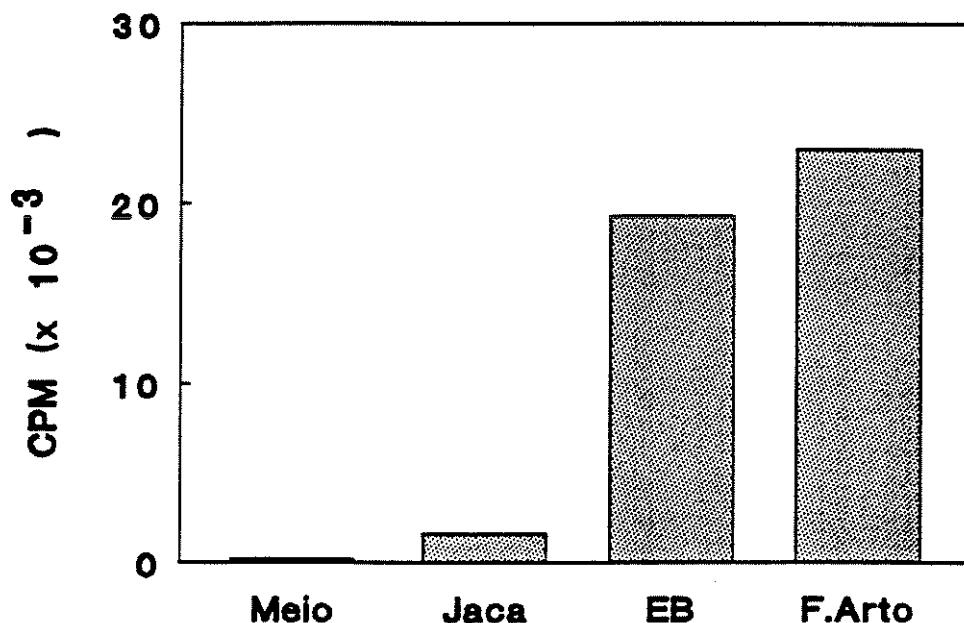
Células mononucleares esplênicas ( $5 \times 10^5$ /poço) foram incubadas com E.B., F. Arto e Jacalina numa concentração que variou de 2.5 a 80 µg/ml, por 72 horas. A avaliação da proliferação foi feita pela leitura da incorporação de <sup>3</sup>H-Timidina. A incorporação de <sup>3</sup>H-Timidina obtida por culturas não estimuladas foi de 1200 cpm.

## **2. PRODUÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO PARA CÉLULAS T (FCCT) POR ESPLÊNOCITOS ESTIMULADOS COM DIFERENTES LECTINAS**

Com o objetivo de determinar a presença de citocinas associadas com a atividade mitogênica descrita anteriormente na Figura 1, foi avaliado a produção de FCCT por células esplênicas quando estimuladas com a lectina mitogênica presente na F. Arto ou quando estimulas com a lectina não mitogênica Jacalina. No M.C.-E.B. e no M.C.-F. Arto foram detectados grande atividade dessa citocina, como mostra a Figura 2. A CTLL, linhagem dependente de FCCT, quando incubada com M.C.-E.B. e M.C.-F. Arto apresentou grande atividade proliferativa.

## **3. CARACTERIZAÇÃO DO FCCT PRODUZIDO POR CÉLULAS ESPLÊNICAS APÓS ESTIMULAÇÃO COM A FRAÇÃO ARTOCARPINA (F. ARTO).**

Com a finalidade de verificar se a atividade FCCT presente nos sobrenadantes da cultura de células esplênicas estimuladas com F. Arto era mediada pela IL-2 e/ou IL-4, estes sobrenadantes foram ensaiados na presença de anticorpos bloqueadores específicos, como descrito na seção Materiais e Métodos. A Tabela 6 mostra que a proliferação da linhagem de células HT-2 dependentes de IL-2/IL-4, incubadas com M.C.-F. Arto, foi inibida em 75% na presença de anticorpo anti-IL-2 (S4B6) e em 32% na presença do anticorpo anti-IL-4 (11B11). Demonstrando, portanto, que a atividade FCCT presente no M.C.-F. Arto é mediada pelas interleucinas 2 e 4. No M.C.-Con-A também foi observado a presença de ambas as interleucinas, havendo inibição de 30% e 20% com anticorpo anti-IL-2 e anti-IL-4 respectivamente.



**Figura 2. Secreção de FCCT por esplenócitos estimulados com diferentes lectinas de semente de *A. integrifolia*.** Células mononucleares esplênicas de camundongos BALB/c ( $5 \times 10^6$  cel/ml) foram cultivadas por 48 horas na presença de E.B. (20  $\mu$ g/ml), Jacalina (20  $\mu$ g/ml), F. Arto (40  $\mu$ g/ml) ou Con-A (5  $\mu$ g/ml), os sobrenadantes coletados e denominados genericamente de M.C.-teste. A atividade FCCT presente nos M.C.-testes foi avaliada através da incorporação de <sup>3</sup>H- Timidina pela linhagem celular CTLL. Essas foram cultivadas ( $1 \times 10^4$  cel/poço) por 36 horas a 37°C em presença de 50% (v/v) do M.C.-teste.

ESTÍMULO	ANTICORPO		INCORPORAÇÃO <sup>3</sup> H-Timidina (% inibição)
	Anti-IL2	Anti-IL4	
F.Arto	—	—	41040
F.Arto	+	—	10098 (75%)
F.Arto	—	+	27997 (32%)
Con-A	—	—	67657
Con-A	+	—	47657 (30%)
Con-A	—	+	53954 (20%)

**Tabela 6. Produção de IL-2 e IL-4 por esplenócitos após a estimulação com F. Arto.**

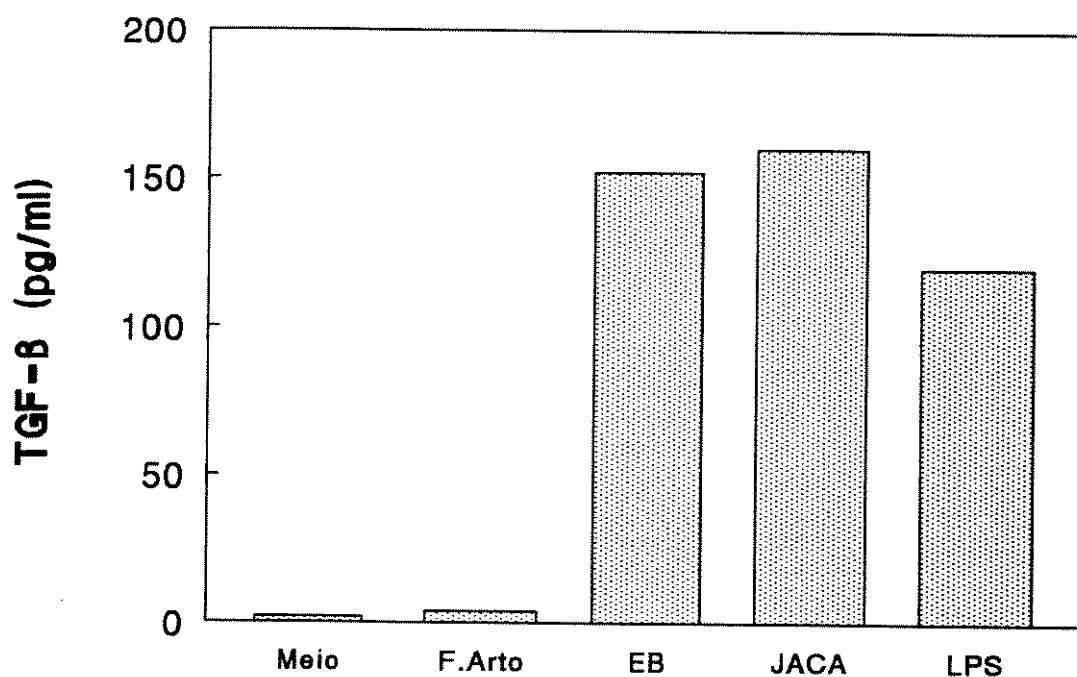
A presença dessas interleucinas no M.C.-F. Arto e no M.C.-Con-A, obtido como descrito na Figura 1, foram avaliadas através da incorporação de <sup>3</sup>H-Timidina pela linhagem celular HT-2. Essas foram cultivadas ( $1 \times 10^4$  cel/poço) por 36 horas a 37°C na presença de 25% do M.C.-teste, adicionando-se ou não Ac-monoclonal anti-IL-2 (S4B6 - 5 µg/ml) ou anti-IL-4 (11B11 - 5 µg/ml).

#### **4. PRODUÇÃO DE TGF- $\beta$ POR ESPLÊNOCITOS APÓS ESTIMULAÇÃO COM DIFERENTES LECTINAS**

Em contraste com o de FCCT, que somente foi produzido por células esplênicas estimuladas com F. Arto, a secreção de TGF- $\beta$  ativo foi induzida somente pela lectina Jacalina como pode ser observado na Figura 3. A Jacalina foi capaz de induzir secreção de aproximadamente 160 pg/ml de TGF- $\beta$  sendo este nível de secreção comparável ao obtido com células estimuladas com E.B. que foi de aproximadamente 152 pg/ml. No M.C.-F. Arto não foi encontrado nível significativo de TGF- $\beta$  ativo.

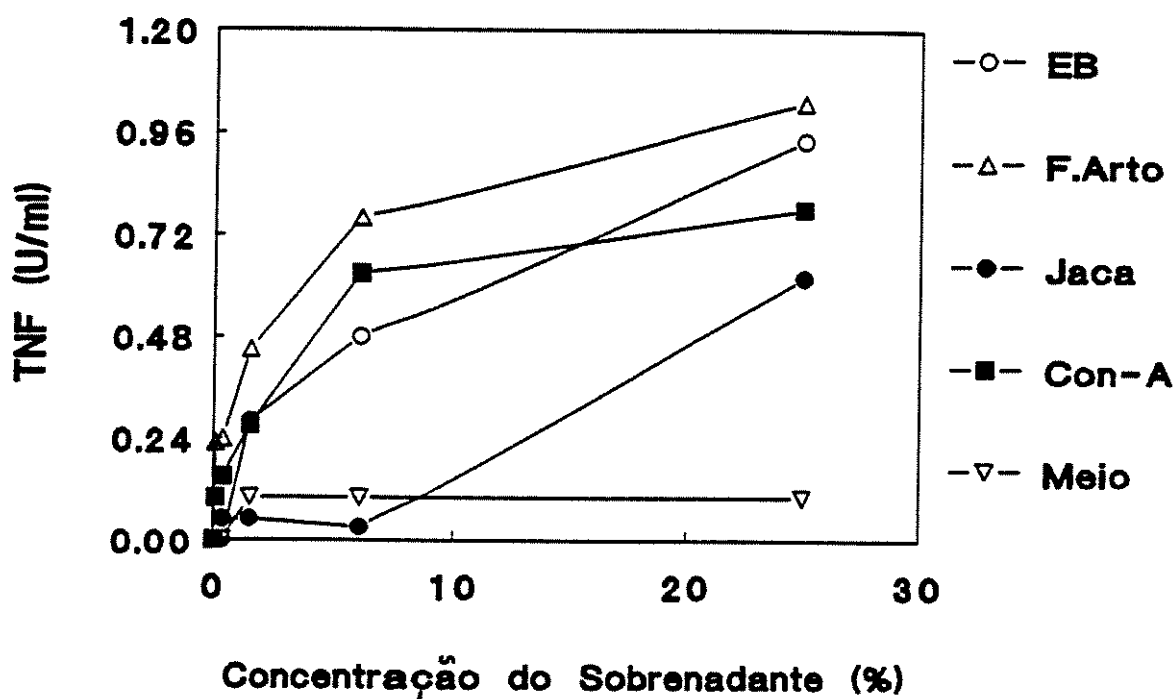
#### **5. PRODUÇÃO DE TNF POR ESPLÊNOCITOS APÓS ESTIMULAÇÃO COM DIFERENTES LECTINAS**

Todas as lectinas testadas foram capazes de induzir a secreção de TNF embora em níveis diferentes (Figura 4). Assim, nos M.C.-E.B., M.C.-F. Arto e M.C.-Con-A foram encontrados grandes concentrações de TNF, 0.48, 0.76 e 0.63 U respectivamente, quando adicionados à cultura numa concentração final de 6.5%. Quantidade significativa de TNF pôde ser detectada nos M.C.-E.B., M.C.-F. Arto e M.C.-Con-A, ainda que esses fossem usados a uma concentração final de 1,5%. Por outro lado, níveis significantes dessa citocina no M.C.-Jacalina só foram detectados quando este foi usado numa concentração final de 25 %.



**Figura 3. Secreção de TGF- $\beta$  por esplenócitos estimulados com diferentes lectinas da semente de *A. intergrifolia*.** A atividade TGF- $\beta$  nos M.C.-testes foi avaliada através da inibição da incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina pela linhagem sensível CCL-64. Essas foram cultivadas ( $1 \times 10^4$  cel/poço) durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  em presença de 50 ml do M.C.-teste.





**Figura 4. Produção de TNF por células esplênicas após a estimulação com diferentes lectinas da semente de *A. integrifolia*.** A presença de TNF nos M.C.-testes, obtidos como descrito na Figura 1, foi avaliada pela incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina por células -WEHI-164 clone 13 viáveis. Essas ( $1 \times 10^4$  cel/ml) foram cultivadas na presença dos M.C.-testes em diferentes concentrações por 24 horas e a unidade de TNF em cada concentração determinada. Uma unidade de TNF foi definida como sendo a concentração que induz morte de 50% das célula WEHI-164 clone 13.

## **6. PRODUÇÃO DE TNF POR CÉLULAS ESPLÊNICAS ADERENTES E NÃO ADERENTES ESTIMULADAS COM LECTINAS**

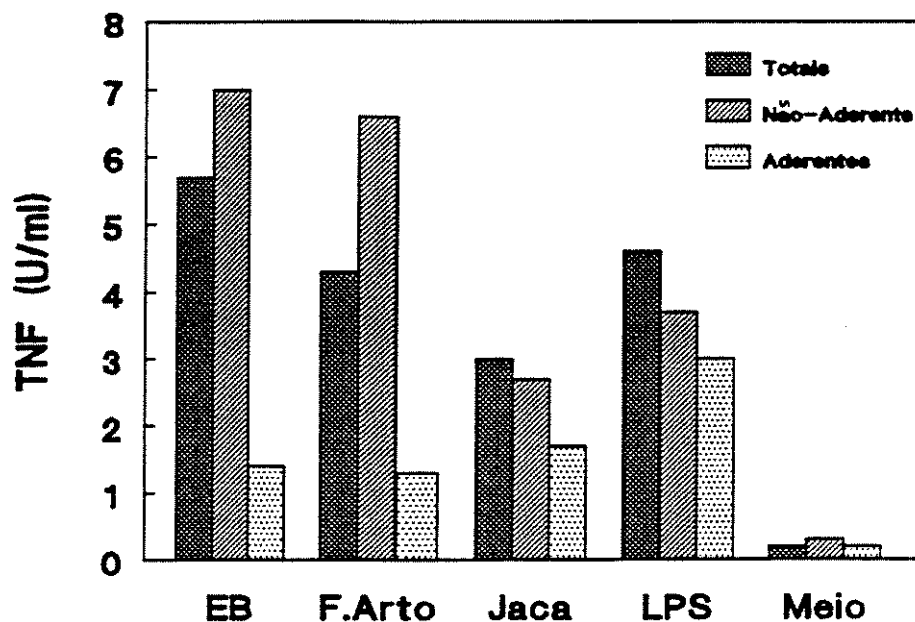
Com a finalidade de avaliar a população celular responsável pela produção de TNF, esplenócitos foram separados em células aderentes e não aderentes, como descrito na seção Materiais e Métodos. Como mostra a Figura 5, a população de células esplênicas aderentes estimuladas com E.B., Jacalina, F. Arto e LPS produziu uma menor quantidade de TNF, que a população de células não aderentes estimuladas com as mesmas lectinas. Estes resultados demonstram que a maior parte do TNF presente nos sobrenadantes das culturas de esplenócitos totais quando estimulados com as diferentes lectinas, foi secretado pela população de células não aderentes.

Salienta-se que a produção desta citocina por células esplênicas estimuladas com Jacalina só foi detectada quando utilizamos M.C.-Jaca na concentração final de 25%. Em concentrações menores, (como mostrado na Figura 4), a Jacalina não estimulou síntese de níveis detectáveis de TNF.

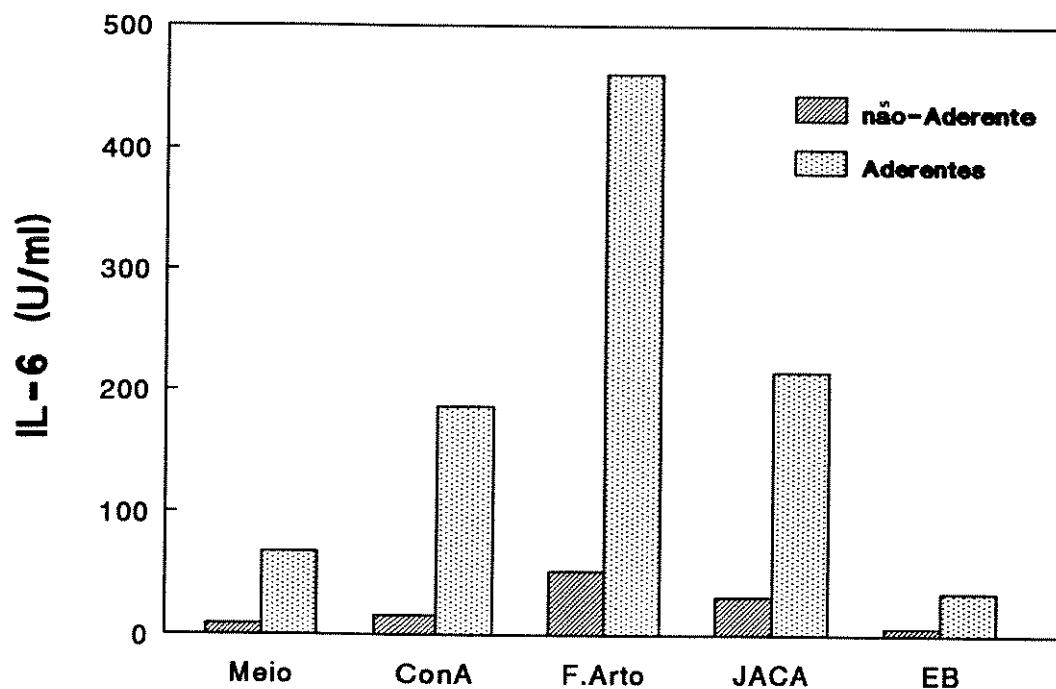
Pode ser observado ainda, nesta Figura 5, que a população de células não aderentes estimuladas com E.B. e F. Arto produziu uma maior quantidade de TNF, quando comparada com a quantidade de TNF secretado por esplenócitos totais não separados, estimulados com as mesmas lectinas.

## **7. SÍNTESE DE IL-6 POR CÉLULAS ESPLÊNICAS ADERENTES E NÃO ADERENTES ESTIMULADAS COM LECTINAS.**

A produção de IL-6 por diferentes populações de células esplênicas murinas estimuladas com os derivados de *A. integrifolia* pode ser observada na Figura 6.



**Figura 5. Produção de TNF por diferentes populações de esplenócitos.** A atividade TNF presente nos M.C.-testes obtidos do sobrenadante da cultura de células mononucleares esplênicas e de populações celulares esplênicas aderentes e não aderentes estimuladas com diferentes lectinas como descrito em Materiais e Métodos, foi avaliada através da incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina por células WEHI-164 clone 13 viáveis. Células WEHI-164 clone 13 ( $1 \times 10^4$  cel/poço) foram cultivadas na presença de 25% dos referidos M.C.-testes por 24 horas. Uma unidade de TNF foi definida como a concentração que induz morte de 50% das células WEHI-164 clone 13.



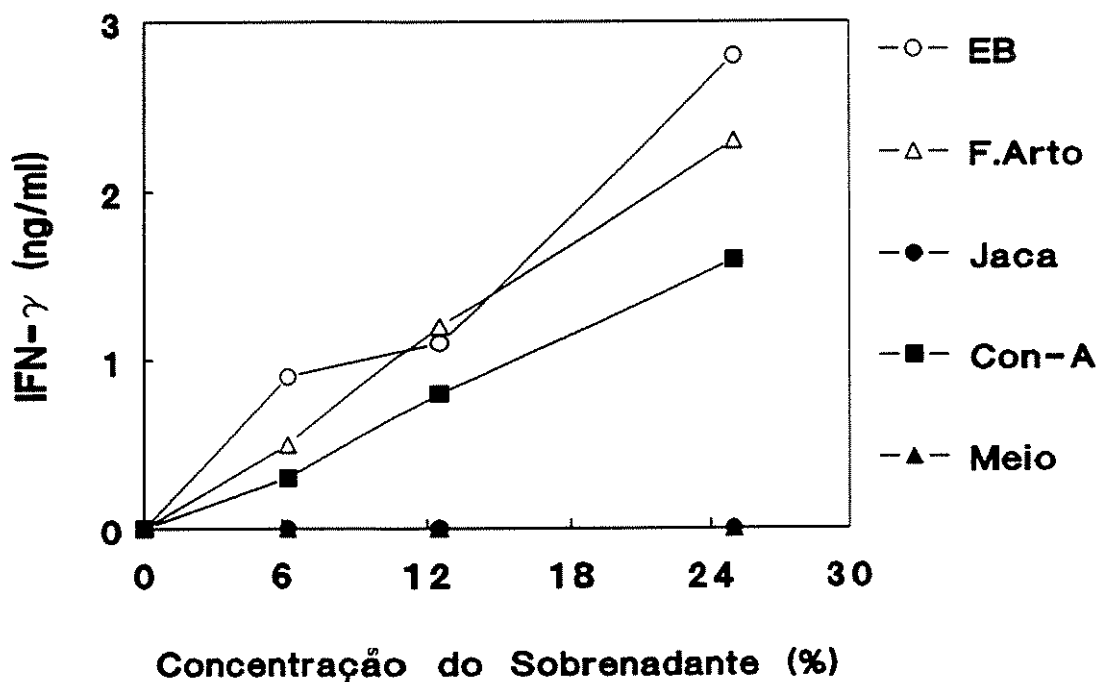
**Figura 6. Produção de IL-6 por diferentes populações de esplenócitos.** A atividade IL-6 presente nos M.C.-testes obtidos do sobrenadante da cultura de populações esplênicas aderentes e não aderentes estimuladas com diferentes lectinas, como descrito em Materiais e Métodos, foi avaliada pela proliferação da linhagem celular B-9. Células B-9 ( $5 \times 10^3$  cel/poço) foram incubadas na presença de 50  $\mu$ l do M.C.-teste por 72 horas, 12 horas antes do término da cultura 0.5  $\mu$ Ci de  $^3$ H-timidina foi adicionado. A concentração (U/ml) de IL-6 presente no M.C.-teste foi determinada a partir da curva padrão utilizando-se IL-6 murino recombinante.

Todas as lectinas foram capazes de estimular células esplênicas aderentes e não aderentes a produzirem IL-6. A população celular esplênica aderente estimulada separadamente com F. Arto, Jacalina, E.B. e Con-A produziu respectivamente 460, 215, 35 e 186 U/ml de IL-6. A produção dessa citocina pela população de células não aderentes, quando estimuladas com as mesmas lectinas, foi de 52 U/ml para F. Arto, 31 U/ml para Jacalina, 6,57 U/ml para E.B. e 16 U/ml para Con-A. Como pode ser observado na Figura 6, quantidade significativamente menor de IL-6 foi produzida pela população de células não aderentes se comparada com população celular aderente, quando estimuladas com lectinas em estudo.

É interessante notar que a F. Arto induziu maior síntese de IL-6 que o mitógeno clássico Con-A.

## **8. PRODUÇÃO DE IFN- $\gamma$ POR ESLENÓCITOS APÓS ESTIMULAÇÃO COM DIFERENTES LECTINAS .**

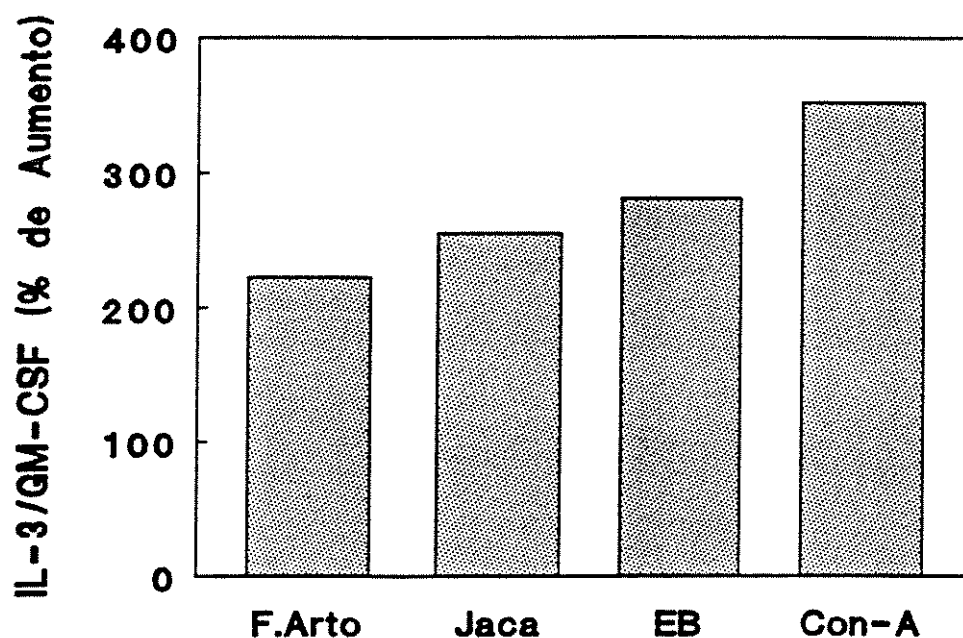
A secreção de IFN- $\gamma$  por esplenócitos estimulados com as diferentes lectinas pode ser observada na Figura 7. Grande concentração de IFN- $\gamma$  foi detectada nos M.C.-E.B., M.C.-F. Arto e M.C.-Con-A (2.8 , 2.3 e 1.6 U respectivamente) numa concentração final de 25%. Aproximadamente 1 ng/ml de IFN- $\gamma$  é ainda detectado nesses meios condicionados na concentração final de 12.5%. Por outro lado, a Jacalina não induziu níveis detectáveis desta linfocina, nas concentrações avaliadas.



**Figura 7.** Produção de IFN- $\gamma$  por esplenócitos após estimulação com diferentes lectinas. Presença de IFN- $\gamma$  nos M.C.-testes foi determinada por ELISA. Foi usado como primeiro ligante o anticorpo monoclonal anti-IFN- $\gamma$  XMG1.2 (10  $\mu$ g/ml) e como segundo ligante o anticorpo policlonal anti-IFN- $\gamma$  produzido em coelho. Concentração de IFN- $\gamma$  (ng/ml) foi determinada por curva padrão realizada para cada ensaio, utilizando-se o IFN- $\gamma$  murino recombinante.

## **9. PRODUÇÃO DE IL-3/GM-CSF POR ESLENÓCITOS APÓS ESTIMULAÇÃO COM DIFERENTES LECTINAS.**

Presença de IL-3/GM-CSF nos meios condicionados pode ser visto na Figura 8. Toda as lectinas estudadas foram capazes de induzir um aumento na produção de IL-3/GM-CSF se comparada com a secreção espontânea dessas citocinas por células mononucleares esplênicas. O E.B. induziu uma porcentagem de aumento de 281%, a F. Arto e a Jacalina induziram níveis de aumento de aproximadamente 223 e 255% respectivamente.



**Figura 8. Produção de IL-3/GM-CSF por células esplênicas estimuladas com diferentes lectinas.** A presença das citocinas IL-3/GM-CSF nos M.C.-testes, obtidos como descrito na Figura 1, foi determinada por ensaio colorimétrico de MTT utilizando-se a linhagem FDCP-1. Essas células ( $1 \times 10^4$  cel/poço) foram incubadas por 48 horas na presença de 20  $\mu$ l de M.C.-teste. A D.O. da cultura foi determinada em leitor de ELISA usando-se filtro de 580 nm. A D.O. obtida quando FDCP foi cultivada na presença de M.C. de cultura não estimulada foi de 0,075.





Os primeiros estudos sobre atividade biológica da lectina Jacalina utilizando-se o extrato bruto da semente de *A. integrifolia*, revelaram que este era um potente mitógeno para células T humanas e um forte ativador policlonal de células B humanas para a secreção de imunoglobulinas (BUNN-MORENO & CAMPOS-NETO, 1981). No entanto, surgiram divergências na literatura quanto a capacidade do extrato bruto de *A. integrifolia* induzir a ativação policlonal de células B humanas (SAXON et al., 1987). Estas discrepâncias foram esclarecidas recentemente por MIRANDA-SANTOS e col. (1991 a e b) que caracterizaram imunoquimicamente e biologicamente o E.B. revelando que este continha duas lectinas: a) a lectina, Jacalina, ligante de D-galactose, purificada por cromatografia de afinidade em coluna de agarose D-galactose, e b) a lectina Artocarpina que está presente no efluente dessa cromatografia e que foi purificada por cromatografia de afinidade em coluna de D-manose. A Jacalina purificada mostrou-se praticamente destituída de atividade mitogênica tanto para células murinas quanto para células humanas. Esta lectina também, não foi capaz de induzir a ativação policlonal de células B humanas. A Artocarpina ao contrário, mostrou-se um forte mitógeno para células T humanas e murinas e também mostrou ser responsável pela ativação policlonal de células B murinas e humanas. Portanto, estas atividades biológicas anteriormente descritas como pertencentes a Jacalina foram recentemente atribuídas à Artocarpina (MIRANDA-SANTOS et al., 1991 a e b).

No presente trabalho foram confirmados os achados de MIRANDA-SANTOS e col. (1991 a e b) visto que a lectina Jacalina não mostra atividade mitogênica sobre células esplênicas murinas e a F. Arto induz grande síntese de DNA nessas células. Esses resultados, portanto, demonstram que a atividade mitogênica obtida com o E.B. é uma propriedade da F. Arto e não da Jacalina.

Com o objetivo de avaliar que sinais as lectinas purificadas do E.B. estão induzindo nas diferentes populações de células imunes que resultam em mitogenicidade ou

não foi analisado o perfil de citocinas produzidas por células esplênicas murinas quando estimuladas com a lectina Jacalina e com a F. Arto.

Como se sabe, a proliferação e diferenciação de linfócitos T são influenciadas por uma variedade de linfocinas derivadas de células T. Entre estas, as mais bem descritas são: IL-2, IL-4 e TGF- $\beta$ . A IL-2 promove a proliferação de células T ativadas (SMITH, 1984) bem como de células B (ZUBLER et al., 1984; HASHIMOTO et al., 1986). A IL-4 que foi conhecida previamente como BSF-1 (B-Cell Stimulatory Factor-1), é agora conhecida como tendo efeito sobre células T e B, bem como, em linhagens de células não linfóides (MOSMANN et al., 1986). O TGF- $\beta$  pode inibir ou estimular a proliferação de células dependendo das condições do meio de cultivo (ROBERTS et al., 1985; TUCKER et al., 1984; MASSAGUE, 1985).

Os resultados aqui apresentados mostraram que a F. Arto induziu a produção significativa de citocinas com atividade de FCCT, enquanto que a lectina não mitogênica, Jacalina, não induziu a secreção desses fatores estimuladores de proliferação (Tabela 6). O FCCT nos sobrenadantes da cultura de células esplênicas estimuladas com F. Arto foi encontrado após incubação por 6, 12, 24 e 48 horas, mas a atividade máxima de FCCT foi encontrada após 24 horas de incubação (dados não mostrados). Esses resultados demonstraram que a única lectina purificada do E.B. de *A. integrifolia* capaz de induzir a secreção de citocina com atividade de FCCT é a lectina mitogênica presente na F. Arto e não a lectina Jacalina.

Realizou-se também uma análise mais detalhada dos meios condicionados utilizando-se anticorpos bloqueadores específicos, para determinar o tipo de interleucina específica responsável por esta atividade de FCCT. Verificou-se que a interleucina predominante nestes meios condicionados era a IL-2. Já a IL-4 foi encontrada, mas em nível menor do que a IL-2 (Tabela 6). Essa grande produção de IL-2 e baixa de IL-4 por células esplênicas não imunes estimuladas "in vitro" pela F. Arto está de acordo com os dados da literatura. Nesse sentido, vários autores comprovaram uma baixa frequência de

células capazes de produzirem IL-4 na população de células linfóides não imunes isoladas de camundongo, e uma frequência muito maior de células produtoras de IL-2, quando estimuladas por antígenos, aloantígenos ou mitógenos (BUDD et al., 1987; POWERS et al., 1988; SWAIN et al., 1988; HAYAKAWA & HARDY, 1989). POWERS e col. (1988), utilizando-se da técnica de diluição limitante mostraram que a frequência de células produtoras de IL-4 aumentava consideravelmente quando se utilizava células de animais imunes após um ciclo de restimulação "in vitro" com o antígeno específico. Vários outros pesquisadores demonstraram que células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IL-4 e não de IL-2 podem ser encontradas após estimulações repetidas destas células com mitógenos ou antígenos específicos (ROCKEN et al., 1991; HAUSER et al., 1989; SWAIN et al., 1988; HAYAKAWA & HARDY, 1989). A estimulação repetida de células esplênicas com Con-A ou com F. Arto não foi capaz de determinar um aumento significativo na produção de IL-4 (dados não mostrados). Uma possível explicação para estes resultados conflitantes seria uma menor sensibilidade da técnica de detecção das interleucinas por nós utilizada. Nos trabalhos citados anteriormente, foram utilizadas técnicas mais sensíveis para detectar o aumento da produção dessas interleucinas, tais como, diluição limitante e hibridização "in vitro" para o RNAm da interleucina específica.

Não foi observada a produção de IL-2 ou IL-4 por células esplênicas estimuladas pela Jacalina em todos os experimentos realizados neste trabalho. A ausência das interleucinas 2 e 4 pode, portanto, ser a causa da incapacidade da lectina Jacalina induzir a proliferação de linfócitos T e a ativação policlonal de células B. Por outro lado, somente a lectina não mitogênica Jacalina estimulou a produção de TGF- $\beta$  na forma ativa por células esplênicas. Esse resultado está de acordo com dados experimentais obtidos anteriormente, onde, essa citocina é descrita como um fator inibidor em certas situações (KEHRL et al., 1986). Portanto, devido ao fato da Jacalina induzir a secreção de TGF- $\beta$  ativo, este pode ser um dos fatores que estariam influenciando de maneira negativa a

atividade do E.B. na ativação policlonal de células B e a proliferação celular de linfócitos T.

A indução de produção de IFN- $\gamma$  foi observada empregando-se o E.B. e a F. Arto (Figura 7). A Jacalina não estimulou níveis detectáveis dessa citocina. Os altos níveis de IFN- $\gamma$  produzido por células esplênicas estimuladas com a F. Arto deve estar relacionado com a especificidade glicídica da lectina. Essa possui especificidade para D-manose e esse resíduo foi sugerido por ITO e col. (1984) estar envolvido na regulação da síntese do IFN- $\gamma$ . Esses mesmos autores demonstraram ainda que algumas lectinas mitogênicas para células T e B como, a Con-A, a Con-A-succinilada (Con-A-S), o *Lens culinaris*-tipo-B (LcH-B) e o mitógeno Pokweed (PWM) são capazes de induzir a secreção de IFN- $\gamma$  em culturas de células esplênicas murinas. Observaram também que as lectinas não mitogênicas como as presentes em *Lotus tertagonolobus*, *Ulex europeus*-Bruto (UEA), *Bandeiraea simplicifolia*-II (BS-II), *Solanum tuberosum* (STA) e a aglutinina do germe de trigo (WGA) induzem a secreção de IFN- $\alpha/\beta$ . No presente trabalho, não foi estudado a indução da secreção destas últimas citocinas.

O trabalho realizado por CRANE e col. (1984) descreve a produção de INF- $\gamma$  por células T do sangue periférico humano quando estimuladas pelo extrato bruto de *A. integrifolia* por ele denominado de Jacalina. Com a utilização de lectinas purificadas neste trabalho, podemos afirmar que o INF- $\gamma$  induzido pelo E.B. é selecionado pela lectina presente na F. Arto e não pela lectina Jacalina.

Em relação ao TNF, maior nível de produção desta citocina foi estimulado pela lectina mitogênica, sendo que a produção máxima desta citocina ocorreu após 48 horas de incubação. (dado não mostrado). Este dado está de acordo com o de GRANGER & WILLIAMS (1968) que descreveram a produção de fator citotóxico, que eles denominaram de linfotoxina, por células murinas e leucócitos humanos, depois da estimulação com mitógenos para células T como a PHA. JACOBS & PORETZ (1980), descreveram a produção de substâncias solúveis com atividade de linfotoxina por

leucócitos estimulados com as lectinas mitogênicas de *Cananavaliala ensiformis* e de *Wistaria floribunda*, enquanto que a lectina hemaglutinante não mitogênica da semente de *Wistaria floribunda* não estimulou a produção de fatores com atividade de linfotóxina. A lectina não mitogênica, Jacalina, parece possuir baixa capacidade para estimular a síntese de TNF, já que este só foi detectado no M.C.-Jacalina na concentração final de 25% (Figuras 4 e 5).

É importante descrever-se aqui sobre a confusa nomenclatura usada para fatores com atividade biológica de linfotóxina. Como citado anteriormente, no sobrenadante da cultura de leucócitos humanos estimulados com antígeno ou mitógenos é encontrado quase sempre vários fatores com atividades de citotoxicidade. Estes fatores eram antigenicamente indistinguíveis até a clonagem dos genes para TNF humano (PENNICA et al., 1984) e murino (PENNICA et al., 1985; FRANSEN et al., 1985) que claramente mostrou serem duas moléculas distintas, mas com funções biológicas relacionadas. Foi então mostrado que células T secretam a linfotóxina e macrófago o TNF (RUDDLE, 1986). Devido as semelhanças nas atividades biológicas do TNF e da linfotóxina SHALABY e col., 1985, propuseram uma nova nomenclatura chamando de TNF- $\alpha$  o TNF, e de TNF- $\beta$  a linfotóxina.

No presente trabalho, não foi feita uma análise que diferenciasse o TNF- $\alpha$  do TNF- $\beta$ , por isso empregamos o nome genérico de TNF ao fator com atividade biológica de matar a linhagem sensível WEHI-164 clone 13. Foi realizado no entanto, uma análise das populações de células esplênicas produtoras de TNF. Como mostra a Figura 5, a maior parte do TNF produzido por esplenócitos originou-se da população de células não aderentes. E quando esplenócitos totais foram separados e estimulados com E.B. ou F. Arto, mais TNF foi produzido por células não aderentes do que pelas células não separadas. Este resultado está de acordo com o obtido por PICHYANGKUL e col. (1985). Estes autores descrevem inclusive que a readição de células aderentes à cultura de

células não aderentes reduz o título da linfotoxina produzida, sugerindo a presença de possíveis fatores supressores na população de células aderentes.

Como mostra a Figura 6, todas as lectinas em estudo foram capazes de estimular tanto a população de células aderentes como a de células não aderentes a produzirem IL-6. Estes resultados estão de acordo com os da literatura, uma vez que as células T, as células B e os macrófagos são descritos como fonte de IL-6 (ROOK et al., 1992). É descrito ainda, que a produção de IL-6 é induzida após a secreção de IL-1 e/ou de TNF por monócitos/macrófagos (ABBAS et al., 1991). Uma possível explicação para a produção de IL-6 por células não aderentes, seria a presença de células aderentes contaminantes que estariam sintetizando as citocinas necessárias para a indução de síntese de IL-6. Pequenas concentrações destas citocinas estimulantes são suficientes para induzir a produção de IL-6 por células não aderentes (ABBAS et al., 1991).

O envolvimento da IL-6 na ativação de célula T foi descrito independentemente por vários investigadores (LOTZ et al., 1988; UYTENHOVE et al., 1988; GARMAN et al., 1987; HOUSSIAU et al., 1988; TOSATO & PIKE, 1988; CEUPPENS et al., 1988). O consenso obtido desses estudos é que a IL-6 representa um componente essencial, que sinergiza com a IL-1, para controlar os passos iniciais na ativação de célula T.

O extrato bruto de sementes de *A. integrifolia*, a lectina presente na F. Arto, bem como a Jacalina foram capazes de induzir a síntese de IL-3/GM-CSF. A síntese dessa citocina parece não estar sobre controle rígido, já que os linfócitos T e os fagócitos mononucleares quando ativados pelos mais diversos fatores secretam esta citocina.

Demonstrou-se neste trabalho que ambas as lectinas estudadas são indutoras da síntese de IL-3/GM-CSF, TNF e de IL-6; e a Jacalina indutora seletiva de TGF- $\beta$  mas não de IL-2 e IL-4. Já a F. Arto é um indutora seletiva de IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$  e não de TGF- $\beta$ .

A seletividade da Jacalina e da F. Arto quanto aos tipos de citocinas por elas induzidas vêm de encontro as novas frentes de estudos sobre as vias alternativas de ativação celular, que podem envolver ou não o TCR. Uma dessas vias, objetivos de estudos recentes, tem sua sinalização transduzida através da molécula CD28 (JUNE et al., 1990) presentes em células T e sua ativação aumenta a expressão de várias citocinas. Células humanas ou murinas estimuladas com anti-CD3 imobilizado produzem a IL-3, mas não a IL-2 (NOBREGA et al., 1990; GUBA et al., 1989). No caso de células humanas verificou-se que a expressão de IL-3 induzida por anti-CD3 limita-se a população positiva para CD28, sendo que essa expressão pode ser aumentada através de sinal coestimulatório mediado por anticorpos anti-CD28. É interessante notar, que em certas situações os anticorpos anti-CD28 inibem a proliferação celular induzida por antígeno específico ou reação mista de linfócitos alogênicos ou autólogos (JUNE et al., 1990). A Jacalina tem um perfil de atividades biológicas semelhantes àquele mediado por CD3 e CD28 no que diz respeito ao padrão de secreção de IL-3 e na atividade antiproliferativa. Será interessante verificar, se a Jacalina está interagindo com essas moléculas, e em caso positivo qual o papel dos resíduos de carboidratos nelas encontradas, uma vez que, os sítios discretos de uma mesma molécula podem transmitir sinais variados que resultam na iniciação de específica resposta biológica.

Outras lectinas empregadas no estudo da ativação celular também apresentam seletividade quanto ao perfil de interleucinas induzidas. O PWM por exemplo, induz a produção de IL-4 e IFN- $\gamma$ , mas não de IL-2 e IL-5 (SANDER et al., 1991).

Podemos concluir que as sínteses de TNF, IL-3/GM-CSF e de IL-6 podem ser associadas aos resíduos glicídicos de D-manose ou D-galactose; as sínteses de IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$  ao resíduo de D-manose e finalmente síntese de TGF- $\beta$  ao resíduo de D-galactose.



Portanto, as lectinas estudadas neste trabalho podem servir como uma interessante ferramenta para o entendimento do papel de resíduos de carboidratos na transdução de sinais durante o processo de ativação celular.



As duas lectinas presentes em sementes de *A. integrifolia* foram obtidas por cromatografia de afinidade. Uma é a lectina não mitogênica Jacalina, ligante de D-galactose; e a outra é a lectina mitogênica Artocarpina que possui especificidade para resíduos manosídeos.

Essas duas lectinas foram utilizadas para se estudar o perfil de citocinas produzidas por células esplênicas murinas quando estimuladas por lectinas com distintas especificidade para carboidratos.

Os resultados mostraram que a F. Arto é capaz de estimular a síntese de IL-2, IL-4, TNF e IFN- $\gamma$ . Esta lectina não foi no entanto capaz de induzir a síntese de TGF- $\beta$ . Em contraste a Jacalina induziu altos níveis de TGF- $\beta$ , baixos níveis de TNF mas não induziu a secreção de IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$ . As citocinas IL-3/GM-CSF e IL-6 foram estimuladas igualmente por ambas lectinas.

Estes resultados sugerem por conseguinte que:

- a.** as sínteses de TNF, IL-3/GM-CSF e IL-6 estão associadas aos resíduos glicídicos de D-manose ou D-galactose;
- b.** as sínteses de IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$  estão associados ao resíduo de D-manose e
- c.** a síntese de TGF- $\beta$  está associada ao resíduo de D-galactose.

**VII. SUMMARY**

In the present thesis we investigated the pattern of cytokine secretion by murine spleen cells after the stimulation with two lectins specific for distinct carbohydrates.

The lectins Jacalin and Artocarpin, specific for D-galactose and D-mannose respectively were obtained from the seeds of *Artocarpus integrifolia* by affinity chromatography and were used in these studies. Both lectins bind to murine spleen cells but the fate of this binding is different. The binding to the D-mannose containing cell surface molecules caused the spleen cells to proliferate. In contrast the cell activation via D-galactose containing cell surface molecules did not induce the spleen cells to proliferate.

Consistent with these results was the pattern of cytokine secreted by the spleen cells. Thus, the activation of the spleen cells with F. Artocarpin caused the secretion of IL 2, IL 4, IFN- $\gamma$  and TNF. However the binding of F. Artocarpin to the spleen cells did not induce the secretion of TGF- $\beta$ . In contrast the activation of the spleen cells via the D-galactose cell surface molecules, induced by Jacalin, resulted in large production of TGF- $\beta$ , little production of TNF and no secretion of IL 2, IL 4 and IFN- $\gamma$ . The secretion of IL3/GM-CSF and IL 6 was equally induced by the binding of the lectins to either D-mannose or D-galactose containing cell surface molecules.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARDEN, L.A. et. al. (34 autors). 1979. Revised nomenclature for antigen-nonspecific T cell proliferation and help factors. **J. Immunol.**, **123**:2928-2929.
- AARDEN, L.A.; GROOT, E.R.; SCHAAP, O.L. & LANSDORP, P.M. 1987. Production of hybridoma growth factor by human monocytes. **Eur. J. Immunol.**, **17**: 1411-1416.
- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. & POBER, J.S. 1991. Cytokines. In: **Cellular and molecular Immunology**. W.B. Saunders Company. p. 225-243.
- ADACHI, Y.; OHNO, N.; OHSAWA, M.; OIKAWA, S. & YADMNE, T. 1989. Physicochemical properties and antitumor activities of chemically modified derivatives of antitumor glucan grifolan LE from *Grifolia frondosa*. **Chem. Pharmac.**, **37**: 1838-1843.
- ADES, E.W.; HINSON, A. & DECKER, J.M. 1981. Effector cell sensitivity to sugar moieties. I- Inhibition of human Natural Killer cell activity by monosaccharides. **Immunobiology**, **160**: 248-258.
- ANDRE, P.M.; LE POGAMP, P. & CHEVET, D. 1990. Impairment of jacalin binding to serum IgA nephropathy. **J. Clin. Lab. Anal.**, **4**: 115-119.
- APPUKUTTAN, P.S. & BASU, D. 1985a. Four identical subunits in jack fruit seed agglutinin offer only two saccharide binding sites. **FEBS**, **180**: 331-334.
- APPUKUTTAN, P.S. & BASU, D. 1985b. Binding site amino acid residues of jack fruit (*Artocarpus integrifolia*) seed lectin: Chemical modification and protein difference spectral studies. **J. Biosci.**, **7**: 7-14.
- AUCOUTURIER, P.; MIHAESCO, E.; MIHAESCO, C. & PREUD HOMME, J.L. 1987. Characterization of jacalin, the human IgA and IgD binding lectin from jackfruit. **Mol. Immunol.**, **24**: 503-511.
- AUCOUTURIER, P.; PINEAU, N. & PREUD HOMME, J.L. 1988. A simple procedure for the isolation of human secretory IgA<sub>1</sub> and IgA<sub>2</sub> subclass by a jackfruit lectin, affinity chromatography. **Mol. Immunol.**, **25**: 321-322.
- BACKER, E.T. & HARFF, G.A. 1989. Autoantibodies to lactate dehydrogenase in serum identified by use of immobilized protein G and immobilized jacalin, a jackfruit lectin. **Clin. Chem.**, **35**: 2190-2195.

- BARONDES, S.H. 1984. Soluble lectins: a new class of extracellular proteins. **Science**, **223**: 1259-1264.
- BARONDES, S.H.; GITT, M.A.; LEFFER, H. & COPPER, D.N.W. 1988. Multiple soluble vertebrate galactosideo-binding lectins. **Biochemic.**, **70**: 1627-1632.
- BASU, D.; DELUCAS, L.; PARKS, E. & SUDDATH, F.L. 1988. Preliminary crystallographic study of the -O-galactose-specific lectin from jackfruit (*Artocarpus integra*) seeds. **J. Mol. Biol.**, **201**: 661-662.
- BRUNDA, M.J.; WILTRON, R.H.; HOLDEN, H.T. & VARELIO, L. 1983. Selective inhibition by monosaccharide of tumor cell cytotoxicity mediated by mouse macrophage-like cell lines, and Natural Killer cells. **Int. J. Cancer**, **31**: 373-379.
- BUDD, R.C.; CEROTTINI, J.C. & MACDONALD, H.R. 1987. Selectively increased production of interferon-gamma by subsets of Lyt-2<sup>+</sup> and L3T4<sup>+</sup> T cell identified by expression of Pgp-1. **J. Immunol.**, **138**: 3583-3586.
- BUNN-MORENO, M.M. & CAMPOS-NETO, A. 1981. Lectin(s) extrated from seeds of *Artocarpus integrifolia* (jackfruit): potent and selective stimulator(s) of distint human T and B cell functions. **J. Immunol.**, **127**: 427-429.
- BUNN-MORENO, M.M. 1986. **Atividade estimulatória seletiva do extrato bruto das sementes *Artocarpus integrifolia* (jaca) sobre linfócitos T e B de sangue periférico humano.** Tese. Instituto de Microbiologia. Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- CARON, M.; JOUBERT, R. & BLADIER, D. 1986. Cell growth factors and soluble lectins. **Trends Biochem. Sci.**, **11**: 319-321.
- CEUPPENS, J.L.; BAROJA, M.L.; LORRE, K.; VAN DAMME, J.V. & BILLIAU, A. 1988. Human T cell activation with phytohemagglutinin. The function of IL-6 as an acessory signal. **J. Immunol.**, **141**: 3868-3874.
- CHATTOPADHYAY, U. & BATTACHARYYA, S. 1987. Effect of monosaccharides on tumor associated macrophage mediated phagocytosis of autologous tumor cells. **Med. Sci. Res.**, **15**: 325-326.
- CHIHARA, G. 1983. Immunopharmacology of lentinan and the glucans. **EOS-Riv. Immun. Immunofarmac.**, **5**: 85-108.



- CLAMAN, H.N. 1987. The biology of immune response. **J. Am. Med. Ass.**, **258**: 2834-2840.
- CONE, R.E. 1977. Dynamic aspect of the lymphocyte surface. In lymphocyte: **Struture and Functions. (Edited by Marchelonis J.J.)**, pp 563-583. Marcel Dekker, New York.
- COOK, G.M.W. 1986. Cell superface carbohydrates: molecules in search of a function? **J. Cell Sci.**, **4**: 45-50.
- CRANE, E.I.; LEUNG, H.; BARWICK, S.; PARTI, S. & MEAGER, A. 1984. The preparation of interferon-gamma-producing T-cell hybridomas from jacalin-stimulated T lymphocytes and the SH9 T-cell line. **Immunology**, **53**: 855-859.
- CZOP, J.K. & AUSTEN, K.F. 1985a. A b-glucan inhibitable receptor on human monocytes: its identity with the phagocytic receptors for particulate activators of the aternative complement pathway. **J. Immun.**, **134**: 2588-2593.
- CZOP, J.K. & AUSTEN, K.F. 1985b. Geration of leukotriens by human monocytes upon stimulation of their B-glucan receptor during phagocytosis. **J. Immun.**, **135**: 3388-3395.
- DALMAU, S.R. ; MACIEL, C.M. & FREITAS, C.S. 1989. Jacalin: an excellent lectin for obtaining T cell growth activity from rat spleen cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **22**: 1111-1120.
- DALMAU, S.R. & FREITAS, C.S. 1989. Sugar inibition of the lectin jacalin: comparison of three assays. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, **22**: 6010-6110.
- DATEMA, R.; OLOFSSON, S. & ROMERO, P.A. 1987. Inhibition of glycosylation and glycoprotein processing in viral systems. **Pharmac. ther.**, **33**: 229-286.
- DAVIES, J.A.; COOK, G.M.; STERN, C.D. & KEYNES, R.J. 1990. Isolation from chick somites of a glycoprotein fraction that causes collapse of dorsal root ganglion growth cones. **Neuron.**, **4**: 11-20.
- DiLUZIO, N.R. 1983. A broad spectrum of host defence mechanisms. **Trends Pharmac. Sci.**, **4**: 344-347.
- DiLUZIO, N.R. 1985. Update on the immunomodulation activities of glucans. **Springer Seminars Immunoph.**, **4**: 387-400.

- DOMER, J.E. 1989. Candida cell wall mannan derived oligosaccharide with diverse immunologic properties. **Crit. Rev. Microbiol.**, **17**: 33-51.
- DRICKAMER, K.J. 1988. Two distinct classes of carbohydrate recognition domains in animal lectins. **J. Biol. Chem.**, **263**: 9557-9560.
- ELBEIN, A.D. 1987. Inhibitors of biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharides chains. **A. Rev. Biochem.**, **56**: 497-524.
- ELINOV, N.P.; VICTORSKAYA, G.A.; MARIKLIN, V.A.; MARYUKHTA YU, B. & KOZLOVA, T.V. 1979. Mannan produced by *Rodotorula rubra* strain 14. **Carbohydr. Res.**, **75**: 185-190.
- ESPEVIK, T. & NISSEN-MEYER, J. 1986. A highly sensitive cell line, WEHI-164 clone 13, for measuring cytotoxic factor/tumor necrosis factor from human monocytes. **J. Immunol. Methods**, **95**: 99-105.
- EZEKOWITZ, R.A.B. & STAHL, P.D. 1988. The structure and function of vertebrate mannose lectin-like proteins. **J. Cell. Sci. Suppl.**, **9**: 121-133.
- FAVERO, J.; CORBEAU, P.; NICOLAS, M.; BENKIRANE, M.; TRAVÉ, G.; DIXON, J.F.P.; AUCOUTURIER, P.; RASHEED, S.; PARKER, J.W.; LIAUTARD, J.P.; DEVAUX, C. & DORNAND, J. 1993. Inhibition of human immunodeficiency virus infection by the lectin jacalin and by a derived peptide showing a sequence similarity with gp120. **Eur. J. Immunol.**, **23**: 179-185.
- FERNANDEZ-BOTRAN, R.; KRAMMER, P.H.; DIAMANSTEIN, T.; URH, J.W. & VITETTA, E.S. 1986. B cell stimulatory factor-1 promotes growth of helper T cell lines. **J. Exp. Med.**, **164**: 580.
- FRANSEN, L.; MULLER, R.; MARMENOUT, A.; TAVERNIER, J.; VAN DER HEYDEN, J.; KAWASHIMA, E.; CHOLLET, A.; TIZARD, R.; VAN HERWVERSWEYN, H.; VAN VLIET, A.; RUYSSCHAERT, M.R. & FIEERS, W. 1985. Molecular cloning of mouse tumour necrosis factor and its eucaryotic expression. **Nucl. Acids Res.**, **13**: 4417-4429.
- GARMAN, R.D.; JACOBS, K.A.; CLARK, S.C. & RAULET, D.H. 1987. B-cell-stimulatory factor 2 ( $\beta$ -2 interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **84**: 7629-7633.

- GERRY, I., GERSHON, R. K. & WAKSMAN, B. H. 1972. Potentiation of the T Lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell. **J. Exp. Med.** **136**: 128-142.
- GILLIS, S. & SMITH, K.A. 1977. Long-term culture of tumor specific cytotoxic T-cells. **Nature**, **268**: 154-156.
- GRANGER, G.A. & WILLIAMS, T.W. 1968. Lymphocyte cytotoxicity in vitro: Activation and release of a cytotoxic factor. **Nature**, **218**: 1253-1254.
- GREENE, W.C.; PARKER, Ch. M. & PARKER, Ch. W. 1976. Oposing effect of mitogenic and non-mitogenic lectins on lymphocyte activation. Evidence that wheat germ agglutinin produces a negative signal. **J. Biol. Chem.**, **251**: 4017-4025.
- GREENE, Ch. W. & WALDMANN, T.A. 1980. Inhibition of human lymphocyte proliferation by the non-mitogenic lectin wheat germ agglutinin. **J. Immunol.**, **124**: 2979-2984.
- GUBBA, S.C.; STELLA, G.; TURKA, L.A.; JUNE, C.H.; THOMPSON, C.B. & EMERSON, S.G. 1989. Regulation of Interleukin 3 gene induction in normal human T cells. **J. Clin. Invest.**, **84**: 1701-1706.
- HASHIMOTO, N.; NABHOLZ, M.; MACDONALD, H.R. & ZUBLER, R.H. 1986. Dissociation of interleukin 2-dependent and independent B cell proliferation with monoclonal anti-interleukin 2 receptor antibody. **Eur. J. Immunol.**, **16**: 317-320.
- HAUSER, C.; SNAPPER, C.M.; OHARA, J.; PAUL, W.E. & KATZ, S.I. 1989. T helper cells grown with hapten-modified cultured Langerhans' cells produce interleukin 4 and stimulated IgE production by B cells. **Eur. J. Immunol.**, **19**: 245-251.
- HAYAKAWA, K. & HARDY, R.R. 1989. Phenotypic and functional alteration of CD4<sup>+</sup> T cells after antigen stimulation: resolution of two populations of memory T cells that both secrete interleukin 4. **J. Exp. Med.**, **169**: 2245.
- HORTIN, G.L. 1990. Sulfation of tyrosine residues in coagulation factor V $\alpha$ . **Blood**, **76**: 946-952.
- HOUSIAU, F.; COULIE, P.G.; OLIVE, D. & VAN SNICK, J. 1988. Synergistic activation of human T cells by interleukin 1 and interleukin 6. **Eur. J. Immunol.**, **18**: 653-656.

- ITO, Y.; TSURUDOME, M.; YAMADA, A. & HISHIYAMA, M. 1984. Interferon induction in mouse spleen cells by mitogenic and non mitogenic lectins. **J. Immunol.**, **132**: 2440-2444.
- JACOBS, D.B. & PORETZ, R.D. 1980. Lectin induction of lymphokines in cultured murine leukocytes. **Cell. Immunol.**, **51**: 424-429.
- JACQUES, P.J. 1982. Immuno-modulator polysaccharides. In: SERROU B. et al. - **Current concepts in Human Immunology and Cancer Immunomodulation** Elsevier Biomedical Press, Amsterdam p 429-438. .
- JUNE, C.H.; LEDBETTER, J.A.; LINSLEY, P.S. & THOMPSON, C.B. 1990. Role of the CD28 receptor in T-cell activation. **Immunol. Today**, **11**: 211-216.
- KANELLOPOULOS, J.M.; DEPETRIS, S.; LECA, G. & CRUMPTON, M.J. 1985. The mitogenic lectins from *Phaseolus vulgaris* does not recognize the T3 antigen of human T lymphocytes. **Eur. J. Immunol.**, **15**: 478-486.
- KAWASAKI, N.; KAWASAKI, T. & YAMASHINA, I. 1989. A serum lectin (Mannan-binding protein) has complement-dependent bactericidal activity. **J. Biochem.**, **106**: 483-489.
- KEHRL, J.H.; WAKEFIELD, L.M.; ROBERTS, A.B.; JAKOWLOW, S.; ALVEREZ-MON, M.; DERYNCK, R.; IPORN, M. B. & FAUCI, A.S. 1986. Production of transforming growth factor B by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. **J. Exp. Med.**, **163**: 1037-1050.
- KIMURA, A. & ERSSON, B. 1981. Activation of T-lymphocytes by lectins and carbohydrate-oxidizing reagents viewed as an immunological recognition of cell-surface modifications seen in the most of self major histocompatibility complex antigens. **Eur. J. Immun.**, **11**: 475-482.
- KINA, T.; NISHIKAWA, S. & KATSURA, Y. 1982. T-cell regulation of pokeweed-mitogen-induced polyclonal production in mice. **Immunology**, **47**: 525-534.
- KOGAN, G.; PAVLIAK, K. & MASLER, L. 1988. Structural studies of mannans from the cell walls of the pathogenic yeasts *Candida albicans* serotypes A and B and *Candida parapsilosis*. **Carbohydr. Res.**, **172**: 243-253.
- KONDOH, H.; KOBAYASHI, K.; HAGIWARA, K. & KAGII, T. 1986. Jacalin, a jack-fruit lectin precipitates IgA<sub>1</sub> but not IgA<sub>2</sub> subclass on gel diffusion reaction. **J. Immunol. Methods**, **88**: 171-173.

- KONDOH, H.; KOBAYASHI, K. & HAGIWARA, K. 1987. A simple procedure for the isolation of human secretory IgA of IgA<sub>1</sub> and IgA<sub>2</sub> subclass by a jackfruit lectin, jacalin, affinity chromatography. **Mol. Immunol.**, **24**: 1219-1222.
- KORNBLUTH, J. 1985. Human Natural Killer cells and cytotoxic T lymphocytes requires cell surface carbohydrate determinants for lytic functions. **Cell. Immun.**, **95**: 276-287.
- KUHLMAN, M.; JOINER, K. & EZEKOWITZ, A.B. 1989. The human mannose-binding protein functions as an opsonin. **J. Exp. Med.**, **169**: 1733-1745.
- LeGROS, G.S.; GILLS, S. & WATSON, J.D. 1985. Induction IL-2 responsiveness in a murine IL-3-dependent cell line. **J. Immunol.**, **139**: 4009-4013.
- LIS, H. & SHARON, N. 1986. Lectin as molecules and as tools. **Annu. Rev. Biochem.**, **55**: 35-67.
- LY, A.I. & MISHELL, R.I. 1974. Separation of mouse spleen cells by passage through columns of sephadex G.10. **J. Immunol. Methods**, **5**: 239-242.
- LOTZ, M. ; JIRIK, F.; KABOURIDIS, R.; TSOUKAS, C.; HIRANO, T. ; KISHIMATO, T. & CARSON, D. 1988. B cell stimulating factor 2/interleukin-6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. **J. Exp. Med.**, **167**: 1253-1258.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin reagen. **J. Biol. Chem.**, **193**: 265-275.
- LUTHER, P.; THEISE, H.; CHATTEYEE, B.; KARDUCK, D. & UHLENBRUCK, G. 1980. The lectin from *Viscum album* .I. Isolation, characterization, properties and structure. **Int. J. Biochem.**, **11**: 429-435.
- MACIAG, T.; MAHLMAN, T.; FRIESEL, R. & SCHREIBER, A.B. 1984. Heparin binds endothelial cell growth factor, the principal endothelial cell mitogen in bovine brain. **Science**, **225**: 932-935.
- MAEDA, Y.Y.; CHIHARA, G. & ISHIMURA, K. 1974. Unique increase of serum proteins and action of anti-tumor polysaccharides. **Nature**, **252**: 250-252.

- MAHANTA, S.K.; SAATRY, M.V. & SUROLLA, A. 1990. Topography of the combining region of a Thomsen-Friedenreich-antigen- specific lectin jacalin (*Artocarpus integrifolia agglutinin*). A thermodynamic and circular-dichroism spectroscopic study. **Biochem. J.**, **265**: 831-840.
- MALEY, F.; TRIMBLE, R.B.; TARENTINO, A.L. & PLUMIER-Jr, T.H. 1989. Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. **Analyt. Biochem.**, **180**: 185-204.
- MacDERMOTT, R.P.; KIENKER, L.J.; BEROVICH, H.J. & MUCHMORO, A.V. 1981. Inhibition of spontaneous but not antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by simple sugars: evidence that endogeneous lectins may mediate spontaneous cell-mediated cytotoxicity. **Immunology**, **44**: 143-152.
- MASSAGUE, J. 1985. The transforming growth factors. **Trends Biochem. Sci.**, **10**: 237-240.
- McGUIRE, E.J.; KERLIN, R.; CEBRA, J.J. & ROTH, S. 1989. A human milk galactosyltransferase is specific for secreted, but not plasma, IgA. **J. Immunol.**, **143**: 2933-2938.
- MILLER, H.C.; CHANEY, W.G.; KLINMAN, N.R. & ESSELMAN, W.J. 1982. Regulation of B cell tolerance by murine gangliosides. **J. Cell. Immunol.**, **67**: 390-395.
- MIRANDA-SANTOS, I.K.F.; MENGEL-Jr, J.O.; BUNN-MORENO, M.M. & CAMPOS-NETO, A. 1991a. Activation of T and B cells by a crude extract of *Artocarpus integrifolia* is mediated by a lectin distinct from jacalin. **J. Immunol. Methods**, **140**: 197-203.
- MIRANDA-SANTOS, I.K.F.; DELGADO, M.; BONINI, P.V.; BUNN-MORENO, M.M. & CAMPOS-NETO, A. 1991b. A crude extract of *Artocarpus integrifolia* contains two lectins with distinct biological activities. **Immunol. Letters**, **31**: 65-72.
- MOREIRA, R.A. & AINOUEZ, I.L. 1981. Lectins from seeds of jackfruit (*Artocarpus integrifolia*): isolation and purification of two isolectins from the albumin fraction. **Biol. Plantarum**, **23**: 186-192.
- MORGAN, D. A.; RUSCETTI, F. W. & GALO, R. C. 1976. Selective in vitro growth of lymphocytes from normal human bone marrow. **Science**, **193**: 1007-1008.

- MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, **65**: 55-63.
- MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIELDMAN, M.A. & COFFMAN. 1986. Two types of murine helper clone. I- Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, **136**: 2348-2357.
- MUCHMORE, A.V. & DECKER, J.M. 1987. Evidence that recombinant IL-1 $\alpha$  exhibits lectin-like specificity and binds to homogeneous uromodulin via N-linked oligosaccharides. **J. Immunol.**, **138**: 2541-2546.
- MUELLER, E.; SCHROEDER, C.; SCHAUER, R. & SHARON, N. 1983. Binding and phagocytosis of sialidase-treated rat erythrocytes by a mechanism independent of opsonins. **Hoppeseyler's Z. physiol. Chem.**, **364**: 1419-1429.
- NOBREGA, A.F.; dos REIS, G.A. & FUCS, R. 1990. Naturally activated and resting T cells differ in their activation requirements for growth and secretory activities. **Cell. Immunol.**, **125**: 120-129.
- ODA, S.; SATO TOYOSHIMA, S. & OSAWA, T. 1989. Binding of activated macrophages to tumor cells through a macrophage lectin and its role in macrophage tumoricidal activity. **J. Biochem.**, **105**: 1040-1043.
- OPPENHEIM, J.J.; RUSCETTI, F.W. & FALTYNEK, C. 1991. Cytokines. In: STITES, D.P. & TERR, A.I. **BASIC and Clinical Immunology USA** Prentice Hall, p. 78-108.
- PENNICA, D.; NEDWIN, G.E.; HAYFLICK, J.S.; SEEBURG, P.H.; DERYNEK, R.; PALLADINO, M.; KOHR, W.; AGGARWAL, B. & GOEDDIL, D. 1984. Human tumor necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. **Nature**, **312**: 724-729.
- PENNICA, D.; HAYFLICK, J.S.; BRINGMAN, T.S.; PALLADINO, M.A. & GOEDDEL, D.V. 1985. Cloning and expression in *Escherichia coli* of cDNA for murine tumor necrosis factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **82**: 6060-6064.
- PEREIRA, M.E.A.; LOURES, M.A.; VILLALTA, F. & ANDRADE, A.F.B. 1980. Lectin receptors as markers for *Trypanosoma cruzi*. **J. Exp. Med.**, **152**: 1375-1392.

- PICKYANGKUL, S.; MILLER, J.E.; WALDROP, S. & KHAN, A. 1985. Cellular origin of human lymphotoxin and its purification. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, **35**:22-34.
- PILMOTT, N.J.G. & MILLER, R.G.J. 1986. Glycopeptides inhibits allospecific cytotoxic T-lymphocyte recognition in a MHC-specific manner. **J. Immunol.**, **136**: 6-11.
- PODZORSKI, R.P.; GRAY, G.R. & NELSON, R.D. 1990. Different effects of native *Candida albicans* mannan derived oligosaccharides on antigen-stimulated lymphocyte proliferation in vitro. **J. Immunol.**, **144**: 707-716.
- POWERS, G.D.; ABBAS, A.K. & MILLER, R.A. 1988. Frequencies of IL-2 and IL-4 secreting T cells in naive and antigen-stimulated lymphocyte populations. **J. Immunol.**, **140**: 3352-3357.
- RANCHALIS, J.E.; GENTRY, L.; OGAWA, Y.; SEYEDIN, S.M.; MCPHERSON, J.; PURCHIO, A. & TWARDZIK, D.R. 1987. Bone derived and recombinant transforming growth factor-B are potent inhibitors of tumor cell growth. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **148**: 783-789.
- RAZ, A. & LOTON, R. 1987. Endogenous galactoside-binding lectins: a new class of functional tumor cell surface molecules related to metastasis. **Cancer Metastasis Rev.**, **6**:433-452.
- REICHERT, C.F.; PAN, P.M.; MATHEWS, K.P. & GOLDSTEIN, I.J. 1973. Lectin induced blast transformation of human lymphocytes. **Nature.**, **242**: 146-148.
- ROBERTS, A.; ANZARRO, M.; WAKEFIELD, L.M.; ROCHE, N.S.; STERN, D.F. & SPORN, N.S. 1985. Type B transforming growth factor: a bifunctional regulator of cell growth. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **82**: 119-123.
- ROCKEN, M.; MILLER, K.M.; SAURAT, J.H. & HAUSER, C. 1991. Lectins-mediated induction of IL-4-producing CD4<sup>+</sup> T cells. **J. Immunol.**, **146**: 577-584.
- ROOK, G. 1992. Resposta imune mediada por células. Em: ROITT, I.; BROSTOFF, J. & MALE, D. **Imunologia São Paulo**, 2<sup>o</sup> ed. Manole, cap.9, p. 9.1-9.14.
- ROQUE-BARREIRA, M.C. & CAMPOS-NETO, A. 1985. Jacalin: an IgA-binding lectin. **J. Immunol.**, **134**: 1740-1743.



- ROQUE-BARREIRA, M.C.; PRAZ, F.; HALBUBCHS-MECARELLI, L.; GREENE, L.J. & CAMPOS-NETO, A. 1986. IgA-affinity purification and characterization of the jacalin. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **19**: 149-157.
- ROSENSTREICH, D.; FARRAR, J.J. & DOUGHERTY, S. 1976. Absolute macrophage dependency of T-lymphocyte activation by mitogens. **J. Immunol.**, **116**: 131-140.
- RUDDLE, N.H. 1986. Letter to the editor. **J. Immunol.**, **136**: 2335-2336.
- SANDER, B.; CARDELL, S.; MOLLER, G. & MOLLER, E. 1991. Differential regulation of lymphokine production in mitogen-stimulated murine cell spleen cells. **Eur. J. Immunol.**, **21**: 1887-1892.
- SASTRY, M.V.K.; BANAYEE, P.; PANTANJALI, S.R.; SWAMY, M.J.; SWARNALATHA, G.V. & SUROLIA, M.J. 1986. Analysis of saccharide binding to *Artocarpus integrifolia* lectin reveals specific recognition of T-antigen (-B-Gal(1-3)D-GalNAc). **J. Biol. Chem.**, **261**: 11726-11733.
- SAXON, A.; TSUI, F. & MARTNEZ-MAZA, O. 1987. Jacalin, an IgA-binding lectin, inhibits differentiation of human B cells by both a direct effect and by activating T-supressor cells. **Cell. Immunol.**, **104**: 134-141.
- SCHWARZ, R.T. & DATEMA, R. 1982. The lipid pathway of protein glycosylation and its inhibitors: the biological significance of protein bound carbohydrates. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, **40**: 287-379.
- SHALABY, M.R.; AGGARWAL, B.B.; RINDERKNECHT, E.; SVEDERSKY, L.P.; FINKLE, B.S. & PALLADINO, M.A. 1985. Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors. **J. Immunol.**, **135**: 2069-2073.
- SHARON, N. 1975. **Complex carbohydrates: their chemistry, biosynthesis and functions**. Addison Wesley, Reading, M.A. p. 1-53.
- SHARON, N. 1980. Carbohydrates. **Sci. Am.**, **243**: 90-116.
- SHARON, N. & LIS, H. 1989. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, **246**: 227-234.
- SHERBLOM, A.P.; DECKER, J.M. & MUCHMORE, A.V. 1988. The lectin-like interaction between recombinant tumor necrosis factor and uromodulin. **J. Biol. Chem.**, **263**: 5418-5424.

- SHERBLOM, A.P.; SATHYAMOORTHY, N.; DECKER, J.M. & MUCHMORE, A.V. 1989. IL-2, a lectin with specificity for high mannose glycoproteins. **J. Immun.**, **143**: 934-944.
- SHEZEN, E.; LEBOVICI, J. & WOLMAN, A. 1978. Modification of the tuberculin reaction by levan. **Br. J. Exp. Path.**, **59**: 444-460.
- SITKOVSKY, M.; PASTERNAK, M.S.; LYGO, J.P.; KLEIN, J.R. & EDUN, H.N. 1984. Isolation and characterization of Concanavalina-A receptors on cloned cytotoxic T lymphocytes. **Proc. Natn. Acad. Sci. USA**, **81**: 1519-1523.
- SKEA, D.L.; CHRISTOPOULOUS, P.; PLAUT, A.G. & UNDERDOWN, B.J. 1988. Studies on the specificity of the IgA-binding lectin, jacalin. **Mol. Immunol.**, **25**: 1-6.
- SMETS, A. & BOLSCHER, J.G. 1985. Tumor cell surface carbohydrates: involvement in invasion and immune surveillance. In: Galeotti, T., et al. - **Cell Membranes and Cancer**. Elsevier Science, Amsterdam. p. 77-81.
- SMITH, K.A. 1984. Interleukin 2. **Annu. Rev. Immunol.**, **2**: 319-333.
- SPRINGER, T.A. & LASKY, L.A. 1991. Sticky sugars for selectins. **Nature**, **349**: 196-197.
- STAHL, P.D.; RODMAN, J.S.; MILLER, M.J. & SCHLESINGER, P.H. 1978. Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins glycoconjugates and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages. **Proc. Natn. Acad. Sci. USA**, **75**: 1399-1403.
- STAHL, P.D.; SCHLESINGER P.; SIGURDSON, E.; RODMAN, J. & LEE, Y.C. 1980. Receptor mediated pinocytosis of mannose glycoconjugates by macrophages: characterization and evidence for receptor recycling. **Cell** **19**: 207-215.
- STAHL, P.D.; WILEMAN, T.E.; DIMENT, S. & SHEPHERD, V.L. 1984. Mannose specific oligosaccharide recognition by mononuclear phagocytes. **Biol. Cell.**, **51**: 215-218.
- STOOLMAN, L.M.; TENFORD, T.S. & ROSEN, S.D. 1984. Phosphomannosyl receptors may participate in the adhesive interaction between lymphocytes and high endothelial venules. **J. Cell. Biol.**, **99**: 1535-1540.

- STUTMAN, O.; DIEN, P.; WISUN, R.E. & LATTIME, E.C. 1980. Natural cytotoxic cells against solid tumors in mice: blocking of cytotoxicity by D-mannose. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **77**: 2895-2898.
- SURESHKUMAR, G.; APPUKUTTAN, P.S. & BASU, D. 1982.  $\alpha$ -D-galactose-specific lectin from jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) seed. **J. Biosci.**, **4**: 257-261.
- SUNG, S.S.J.; NELSON, R.S. & SILVERSTEIN, S.C. 1983. The role of the mannose/N-acetylglucosamine receptor in the pinocytosis of horseradish peroxidase by mannose peritoneal macrophages. **J. Cell. Biol.**, **96**: 160-176.
- SWAIN, S.L.; MCKENZIE, D.T.; WEINBERG, A.D. & HANCOCK, W. 1988. Characterization of T helper 1 and 2 cell subsets in normal mice: helper T cells responsible for IL-4 and IL-5 production are present as precursors that require priming before they develop into lymphokine-secreting cells. **J. Immunol.**, **141**: 3445-3455.
- TANAKA, K.; ADAMS, D.H.; HUBSCHER, S.; HIRANO, H.; SIEBENLIST, U. & SHAW, S. 1993. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 $\beta$ . **Nature**, **361**: 79-82.
- TORIBIO, M.L.; DELAHERA, A.; PEREIRA, P. & DELANDAZURI, M.O. 1985. Modulation of cytotoxic T cell function by lectins. **J. Immunol.**, **134**: 2179-2184.
- TOSATO, G. & PIKE, S. 1988. Interferon- $\beta$ /interleukin-6 is a co-stimulant for human T lymphocytes. **J. Immunol.**, **141**: 1556-1562.
- TUCKER, R.F.; SHIPLEY, G.D.; MOSES, H.L. & HOLLEY, R.W. 1984. Growth inhibitor from BSC-1 cells closely related to platelet type B transforming growth factor. **Science**, **226**: 705-707.
- UYTTENHOVE, C.; COULIE, P.G. & VANSNICK, J. 1988. T cell growth and differentiation induced by interleukin HP1/IL-6, the murine hybridoma/plasmacytoma growth factor. **J. Exp. Med.**, **167**: 1417-1427.
- WARR, G.A. 1980. A macrophage receptor for (mannose/glucosamine) glycoproteins of potential importance in phagocytic activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, **93**: 737-745.

- WELLS, V. & MALLUCCI, L. 1991. Identification of an autocrine negative growth factor: mouse B-galactoside-binding protein is a cytostatic factor and cell growth regulator. **Cell**, **64**: 91-97.
- WELPLY, J.K. 1989. Sequencing methods for carbohydrates and their biological applications. **Trends Biochem. Technol.**, **7**: 5-10.
- WHISLER, R.L. & YATES, A.J. 1980. Regulation of lymphocyte responses by human gangliosides. I- Characteristics of inhibitory effects and the induction of impaired activation. **J. Immunol.**, **125**: 2106-2111.
- WILKINSON, R. & NEVILLE, S. 1988. Jacalin: its binding reactivity with immunoglobulin A from various species. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, **18**: 195-198.
- WITKIN, S.S.; YU, R. & LEDGER, W.J. 1986. Inhibition of *Candida albicans* induced lymphocyte proliferation by lymphocyte and sera from women with recurrent vaginites. **Am. J. Obstet. Gynec.**, **147**: 809-814.
- WU, A.M.; SUGII, S.; FULTON, R.J.; MAY, R.D.; TILL, M. & UHR, J.W. 1987. A table of lectin carbohydrate specificities. **Lectins: Biol. Biochem. Clin. Biochem.**, **6**: 723-740.
- YANG, H. & CZPLA, T.H. 1993. Isolation and characterization of cDNA clones encoding jacalin isolectins. **J. Biol. Chem.**, **268**: 5905-5910.
- YOUNG, R.C.; BENNETT, J.E.; GEELHOED, G.W. & LEVINE, A.S. 1974. Fungemia with compromised host resistance. A study of 70 cases. **Ann. Intern. Med.**, **80**: 605-616.
- YOUNG, N.M.; JOHNSTON, R.A.Z. & WATSON, D.C. 1991. The amino acid sequences of jacalin and the *Madura pomifera agglutinin*. **FEBS**, **282**: 382-384.
- ZHER, B.D. & LITWIN, S.D. 1987. Human IgD and IgA<sub>1</sub> compete for D-galactose-related binding sites on the lectin jacalin. **Scand. J. Immunol.**, **26**: 229-236.
- ZUBLER, R.H.; LOWENTHAL, J.W.; ERARD, F.; HASHIMOTO, N.; DEVOS, R. & MACDONALD, H.R. 1984. Activated B cells express receptors for, and proliferate in response to, pure interleukin 2. **J. Exp. Med.**, **160**: 1170-1183.