

Elba Verônica Matoso Maciel

**DETERMINAÇÃO DO EFEITO MITOGÊNICO DAS LECTINAS
DE *Cratylia mollis* SOBRE LINFÓCITOS HUMANOS
UTILIZANDO UM MÉTODO COLORIMÉTRICO**

Recife, 2002

Elba Verônica Matoso Maciel

DETERMINAÇÃO DO EFEITO MITOGÊNICO DAS LECTINAS DE *Cratylia mollis* SOBRE LINFÓCITOS HUMANOS UTILIZANDO UM MÉTODO COLORIMÉTRICO

Dissertação apresentada ao Departamento de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Co-Orientação: Profa. Dra. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho

Orientação Externa: Profa. Dra. Yara de Miranda Gomes

A Darlan e à minha mãe Ione,
por todo amor, carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as bênçãos durante a realização da minha dissertação.

Aos meus pais, Hélio Balduino Maciel e Ione Matoso Maciel, por todo apoio, carinho e dedicação concedidos desde os primeiros passos da minha vida até hoje e sempre, a vocês meu eterno obrigado! Amo vocês!

À Professora Doutora Maria Tereza dos Santos Correia que, com toda sua tranquilidade, sempre foi dedicada desde a época de Iniciação Científica até o Mestrado.

À Professora Doutora Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho que, com tanta alegria, carinho e respeito sempre procurou nos mostrar o que é ciência e como fazer ciência.

À Professora Doutora Yara de Miranda Gomes por todo seu carinho e apoio, essenciais nesta fase do Mestrado e também por toda sua dedicação em todas as etapas dos experimentos realizados.

À Professora Doutora Patrícia Paiva Guedes por todo incentivo e confiança nesta minha passagem pelo Mestrado.

Ao Professor Doutor Nicácio Henrique da Silva por sempre ter torcido por mim desde a época do curso de extensão.

Ao Mestre em Bioquímica Vanduir de Araújo Filho, pela sua grande ajuda nesta etapa do Mestrado.

A todos que fazem parte do Grupo de Pesquisa da Dra. Yara Gomes do Laboratório de Imunologia, do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, em especial a Mineo Nakasawa por toda sua boa vontade e ajuda constante.

À coordenação administrativa da PROPESQ, em especial Eduardo José Pereira da Silva e Eliene Santos Pinheiro, pelo grande apoio.

Ao Professor Cláudio Gabriel Rodrigues, do Departamento de Biofísica da UFPE, por toda atenção oferecida para esclarecimento da parte estatística do trabalho.

À técnica Maria Reis Barbosa, pela ajuda constante e troca de idéias.

A todos que compõem o Laboratório de Glicoproteínas pela torcida e, em especial, as meninas de Iniciação Científica e a Josilene Malaquias, Ana Conceição, Andréa Santos, Adriana, Clébia, Flávia, Michelle e Valdenira, por todo incentivo e amizade constantes.

A Teodora Ilana por ter sido sempre muito prestativa e solidária ao longo de todo o Mestrado.

Ao técnico do Departamento de Bioquímica, Otaviano Tavares, pela sua eterna boa vontade e por sempre me ajudar, desde a época de Iniciação Científica até o mestrado.

Aos Secretários do Departamento de Bioquímica, Neide Maria e José Miron, por toda amizade e pela enorme solidariedade comigo.

Ao meu sobrinho João Fernando por todas brincadeiras e diversões.

Às minhas tias Lara, Idalece, Iracema e Iraci por estarem sempre “torcendo” por mim.

A Tonho, Vânia e Taís por sempre desejarem que tudo desse certo comigo.

A Darlan Karlo, pelo eterno apoio, estímulo, carinho, confiança depositada, paciência e até mesmo pelas broncas, quando era necessário, pelas viradas de noite junto comigo e também por sempre ser essa presença tão forte na minha vida e nas minhas decisões. Obrigada pelo colorido que você sempre dá à minha vida! Esta tese também é tua! Te amo.

SUMÁRIO

<i>Agradecimentos</i>	IV
<i>Lista de Figuras</i>	VIII
<i>Lista de Tabelas</i>	IX
<i>Lista de Abreviatura</i>	X
<i>Resumo</i>	XII
<i>Abstract</i>	XIII
1 Introdução	14
1.1 Lectinas	14
1.1.1 Breve Histórico	14
1.1.2 Definição	14
1.1.3 Especificidade	15
1.1.4 Detecção	15
1.1.5 Classificação	16
1.1.6 Ocorrência e Localização	16
1.1.7 Papel Fisiológico	17
1.1.8 Aplicações	18
1.1.9 Purificação	19
1.1.10 Isoformas e Isolectinas	19
1.1.11 <i>Cratylia mollis</i>	19
1.2 Atividade Mitogênica	20
1.2.1 Breve Histórico	20
1.2.2 Métodos Utilizados para Avaliação da Atividade Mitogênica	21
1.2.3 Ciclo Celular	22
1.2.4 Mecanismo de Proliferação Celular	23
1.2.5 Mecanismo de Proliferação de Linfócitos	26
1.2.6 Atuação das Lectinas como Mitógenos	28
2 Objetivos	30
2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivo Específico	30

3 Relevância do Trabalho	30
4 Bibliografia	31
5 Artigo: Mitogenic Activity of <i>Cratylia mollis</i> lectins on human lymphocytes	41
6 Conclusões	55
Anexos	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Visão geral da planta de <i>C. mollis</i>	20
Figura 2: Redução do MTT a MTT- Formazan	21
Figura 3: Interfase	22
Figura 4: Mitose	23
Figura 5: Esquema representando o mecanismo de proliferação celular	25
Figura 6: Esquema representando o mecanismo de proliferação de linfócitos	27
Figura 7: Esquema representando a atuação das lectinas como mitógenos	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das lectinas nos grupos de reconhecimento a carboidrato	16
Tabela 2: Alguns fatores de crescimento e suas ações	24

LISTA DE ABREVIATURAS

AH – Atividade Hemaglutinante.

AP1 – Complexo formado pelas proteínas Fos e Jun.

APC – Célula apresentadora de antígenos (do inglês: *antigen presenting cell*).

Con - A – Concanavalina A (lectina de sementes de *Canavalia ensiformis*).

Cra Iso 1 – Isoforma 1 (lectina de sementes de *Cratylia mollis*).

Cra Sephadex – Preparação de lectinas de sementes de *C. mollis* obtida por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex.

Drk – Proteína adaptadora (do inglês: *Downstream of receptor kinasis*).

EGF – Fator de crescimento epidérmico (do inglês: *Epidermal Growth Factor*).

Fos – Proteína fos (do inglês: *Feline osteosarcoma virus*).

GRb2 – Proteína que se liga ao receptor do fator de crescimento (do inglês: *Growth factor receptor-binding protein*).

GDP – Guanidina difosfato.

GTP – Guanidina trifosfato.

IL-2 – Interleucina 2 (do inglês: *Interleukin 2*).

IL-2R – Receptor de Interleucina 2 (do inglês: *Interleukin 2 Receptor*).

Jun – Proteína jun (do japonês: *ju-nana*, que significa o número 17).

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno (do inglês: *Mitogen-Activated Protein Kinase*).

MAPKK – Proteína quinase quinase ativada por mitógeno (do inglês: *Mitogen-Activated Protein Kinase kinase*).

MAPKKK – Proteína quinase quinase quinase ativada por mitógeno (do inglês: *Mitogen-Activated Protein Kinase kinase Kinase*).

MBL – Lectinas que ligam a manose (do inglês: *mannan-binding lectin*).

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade.

MTT – 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium.

NF-AT1 – Fator nuclear de células T ativadas (do inglês: *Nuclear factor of activated T cell*).

NGF – Fator de crescimento do nervo (do inglês: *Nerve Growth Factor*).

PGDF – Fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês: *Platelet-Derived Growth Factor*).

PHA – Fitohemaglutinina (lectina de sementes de *Phaseolus vulgaris*).

P36 – Polipeptídeo pesado (do inglês :*Heavy polypeptide*).

RAS – Sarcoma de rato (do inglês: Rat sarcoma).

RPMI 1640 – Rowell Park Memorial Institute 1640 Medium.

SOS – do ingles: *Son of Sevenless*.

SRF – Fator de resposta do soro.

TCR – Receptor de células T (do inglês: *T Cell Receptor*).

As abreviaturas e símbolos utilizados neste trabalho e não presentes nesta relação são descritos como convenções adotadas.

RESUMO

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas que se ligam a carboidratos específicos. Algumas delas exibem atividade mitogênica sobre linfócitos humanos *in vitro* ou são tóxicas para estas células em cultura. Estas propriedades estão envolvidas com o sítio de ligação a carboidratos. Neste trabalho foi determinada a atividade mitogênica das lectinas de *Cratylia mollis* (Cra-Sephadex e Cra Iso 1) sobre linfócitos humanos através de um ensaio colorimétrico que tem como princípio a redução do 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT), através de uma enzima mitocondrial tetrazólio-succinato-desidrogenase, em MTT-formazan, um produto de coloração azul escuro. As isoformas de *C. mollis* foram purificadas seguindo um protocolo estabelecido. Os linfócitos foram isolados do sangue periférico humano através de um gradiente de densidade dado pelo histopaque. Amostras de lectinas (Cra Sephadex, Cra-Iso 1, concanavalina A, Con-A e fitohemaglutinina, PHA) em variadas concentrações, foram utilizadas para este ensaio. Posteriormente, foi realizado um ensaio de inibição da atividade mitogênica utilizando o carboidrato metil α -D-manosídeo. Os resultados obtidos foram expressos em índice de proliferação (PI, do inglês: *Proliferation Index*), o qual representa a razão entre a absorbância da proliferação na presença e na ausência de lectina. Ambas as lectinas de *C. mollis* são mitogênicas. Os efeitos destas lectinas são comparáveis com aquelas lectinas mitogênicas, como con-A e PHA. A inibição da proliferação de linfócitos, com o carboidrato ligante, indicou que esse efeito mitogênico está envolvido com sítio de ligação da lectina.

ABSTRACT

Lectins are proteins or glycoproteins that bind to specific saccharides. Several of them exhibit mitogenic activity on lymphocytes *in vitro* or are toxic in cultured cells. These properties are involved with carbohydrate binding sites. In this work it was determined the mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectins (Cra-Sephadex and Cra-Iso 1) on human lymphocytes through a colorimetric assay that is based upon the reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT), through a mitochondrial enzyme tetrazolium-succinate-desidrogenase, in MTT-formazan, which is a dark colored product. The isoforms of *C. mollis* are purified following a previously established protocol. Lymphocytes were previously isolated from the periferic human blood through a density gradient given by histopaque. Lectin samples (Cra-Sephadex, Cra Iso 1, concanavalina A, Con-A and phytohaemagglutinine, PHA) at different concentrations were utilized in this assay. Subsequently it was performed a mitogenic activity inhibition assay utilizing the carbohydrate methyl α -D-mannoside. The obtained results were expressed as a proliferation index, PI, which stands for the ratio between the proliferation absorbance in the presence and in the absence of the lectin. Both *C. mollis* lectins are mitogenic and the effects of these lectins are comparable to the mitogenic lectins, such as Con-A and PHA. The inhibition of the lymphocyte proliferation utilizing the binding carbohydrate indicated that these mitogenic effect to be involved to the lectin binding site.

1 INTRODUÇÃO

1.1 LECTINAS

1.1.1 Breve Histórico

O estudo de lectinas começou no século 19 com a descoberta de que extratos de certas plantas além de serem tóxicos para homens e animais poderiam também aglutinar eritrócitos. Acreditava-se que este efeito tóxico ocorria devido à contaminação por toxinas bacterianas. Esta hipótese foi desacreditada quando Bruylants e Vennerman em 1884 demonstraram que a toxicidade da semente de *Abrus precatorius* devia-se a uma fração protéica que podia ser precipitada com álcool a partir de um extrato aquoso da semente (Moreira *et al.*, 1991). Hermann Stillmark, em 1888, ao observar aglutinação de células vermelhas do sangue (atividade hemaglutinante) por extratos do feijão castor (*Ricinus communis* – Ricina), ampliou o estudo de aplicações destas proteínas (Gabor *et al.*, 2001). Estas informações atraíram a atenção de Paul Ehrlich que, trabalhando com uma proteína de *Abrus precatorius* com propriedade similar à ricina, na última década de 1800, introduziu as lectinas dentro da pesquisa imunológica (Sharon, 1989; Kennedy *et al.*, 1994). Devido às lectinas terem a habilidade de se ligar a mono e oligossacarídeos cada ligação pode resultar em uma variedade de efeitos biológicos (Machuka *et al.*, 1999). Alguns destes efeitos servem como base para a aplicação de lectinas na investigação de problemas químicos e biológicos, como por exemplo, a estimulação mitogênica de linfócitos e a inibição do crescimento de células tumorais (Lis e Sharon, 1986a). Hoje o estudo de lectinas é tão atrativo que vários trabalhos sobre este assunto são publicados a cada ano.

1.1.2 Definição

O termo lectina é derivado do latim, *lectus* (escolhido, selecionado), que reflete etimologicamente sua propriedade de aglutinar grupos sangüíneos (Kennedy *et al.*, 1995; Matsui *et al.*, 2001). Lectinas são proteínas ou glicoproteínas que possuem a habilidade de se ligar especificamente a mono ou oligossacarídeos de forma reversível (Elgavish e Shaanan, 1997; Vijayan e Chandra, 1999; Sato *et al.*, 2000; Hong *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2001). As lectinas constituem um grupo heterogêneo de proteínas de

origem não imunológica de distribuição ubíqua na natureza, contendo dois ou mais sítios de ligação a carboidrato e sua caracterização físico-química é importante para explicar seu comportamento em diferentes propriedades biológicas (Cavada *et al.*, 1998; Machuka *et al.*, 1999; Sacchettini *et al.*, 2001; Sharon e Lis, 2001).

1.1.3 Especificidade

Existem lectinas que possuem especificidade para mais de um carboidrato, aglutinando células de diferentes espécies. Também existem lectinas que só aglutinam as células em que houver a presença de um determinado carboidrato (Kabir, 1998; Sato *et al.*, 2000; Gabor *et al.*, 2001; Coutiño-Rodríguez *et al.*, 2001). Peumans e Van Damme (1998) observaram que lectinas de plantas exibem uma ampla especificidade para carboidrato, sendo que muitas apresentam maior afinidade para oligossacarídeos do que para açúcares simples ou têm especificidade direcionada contra glicanos estranhos (que não são próprios da planta), além disso, lectinas estruturalmente diferentes podem reconhecer o mesmo carboidrato.

A especificidade de uma lectina tem sido analisada através de ensaios de inibição da atividade hemaglutinante (AH), comentado no item 1.1.4, utilizando para isto diferentes carboidratos (Gabor *et al.*, 2001; Ng e Yu, 2001). As lectinas podem se ligar a açúcares livres ou a resíduos de açúcares de polissacarídeos, glicoproteínas ou glicolipídeos, onde estes podem estar livres ou ligados à membrana da célula.

1.1.4 Detecção

A aglutinação de eritrócitos (hemaglutinação) é usada rotineiramente para a detecção da presença de lectinas em uma fonte biológica (Sharon e Lis, 2001). Este ensaio é realizado através de uma diluição seriada da lectina e posterior incubação com eritrócitos (Coelho e Da Silva, 2000; Coutiño-Rodríguez *et al.*, 2001). Lectinas também induzem a precipitação de polissacarídeos ou glicoproteínas em solução, sendo as reações de aglutinação por lectinas inibidas por seus carboidratos específicos. Para assegurar que o agente aglutinante é uma lectina, são necessários ensaios subseqüentes de inibição da atividade hemaglutinante (AH) utilizando uma solução do carboidrato ligante (Rüdiger, 1998; Cavada *et al.*, 2000; Kawagishi *et al.*, 2001). Os eritrócitos utilizados podem ser de humanos ou de animais, onde estes

podem ser tratados enzimaticamente (tripsina, papaína, entre outras) ou quimicamente (glutaraldeído ou formaldeído) aumentando ou não a sensibilidade das células a lectina (Correia e Coelho, 1995; Coelho e Da Silva, 2000; Mo *et al.*, 2000).

1.1.5 Classificação

Por representar um grupo heterogêneo de proteínas, as lectinas diferem fortemente em relação à: estrutura molecular, especificidade ao carboidrato e atividades biológicas.

Existem vários critérios de classificação de lectinas. As lectinas podem, por exemplo, ser agrupadas dentro de famílias distintas de proteínas homólogas que apresentam propriedades estruturais comuns, sendo a família das leguminosas a mais bem estudada e caracterizada (Sharon, 1993; Cavada *et al.*, 1998). As lectinas de plantas (Tabela 1) podem ser classificadas também, de acordo com o carboidrato a que preferencialmente se ligam (Nomura *et al.*, 1998; Peumans e Van Damme, 1998; Rabinovich *et al.*, 1999).

Tabela 1: Classificação das lectinas nos grupos de reconhecimento a carboidrato.

GRUPO	ESPECIFICIDADE	LECTINA
Fucose	Fucose	<i>Ulex europaeus</i> aglutinina I
N-acetilglicosamina	GlcNAc	Wheatgerm (<i>Triticum aestivum</i>)
Galactose/N-acetilgalactosamina	Galactose>>GalNAc Gal= GalNAc Gal<< GalNAc	<i>Artocarpus integrifolia</i> (jacalina) <i>Clerodendron trichotomum</i> <i>Glycine max</i> (feijão de soja-Soybean)
Manose	Manose/Glicose Manose/Maltose Manose	<i>Cratylia mollis</i> Con A (<i>Canavalia ensiformis</i>) <i>Calystegia sepium</i> <i>Galanthus nivalis</i>
Complexo Glicano	Glicoproteína	PHA (<i>Phaseolus vulgaris</i>)

1.1.6 Ocorrência e Localização

As lectinas estão amplamente distribuídas na natureza. No reino das plantas, as sementes de leguminosas são a principal fonte de lectinas, mas estas também são

abundantes em tecidos vegetais tais como: raiz, folha, talo, vagem, frutas, flores e até mesmo casca (Coelho e Da Silva, 2000; Wu *et al.*, 2000; Coutiño-Rodríguez *et al.*, 2001; Ratanapo *et al.*, 2001). A maior quantidade de lectinas de plantas é encontrada nos órgãos de estoque, nas outras partes da planta as quantidades são bem menores, não sendo necessariamente idênticas em relação à estrutura ou especificidade de carboidratos com as lectinas dos órgãos de estoque. Dependendo da planta, os órgãos de estoque apresentam diferentes localizações como, por exemplo, nas leguminosas, estes órgãos encontram-se nas sementes e, na batata, encontram-se no tubérculo (Shangary *et al.*, 1995; Sun e Wang, 1995; Rüdiger, 1998). A localização intracelular da maioria das lectinas nos órgãos de estoque ocorre em organelas celulares originadas de vacúolos, como no caso das sementes em leguminosas (Baba *et al.*, 1991). Algumas lectinas têm sido encontradas também em fungos (Kawagishi *et al.*, 2001), bactérias (Singh *et al.*, 1999), vírus (Cavada *et al.*, 1998), algas (Sampaio *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1999; Sato *et al.*, 2000), protozoários (Singh *et al.*, 1999), peixes (Ewart *et al.*, 2001), dentre outros.

1.1.7 Papel Fisiológico

O papel fisiológico das lectinas de plantas não está claramente definido, mas o crescente estudo sugere que lectinas são proteínas de defesa que podem protegê-las contra ataques de predadores como vírus, fungos e insetos (Cavada *et al.*, 1998; Ratanapo *et al.*, 2001; Sacchetti *et al.*, 2001). Existem várias outras hipóteses sobre a função fisiológica das lectinas de plantas como, por exemplo, reconhecimento celular, simbiose, estoque de proteínas (Van Damme *et al.*, 1997) e também na estimulação da proliferação e crescimento celular da planta (Wititsuwannakul *et al.*, 1997). O papel das lectinas nos fungos continua desconhecido (Kawagishi *et al.*, 2001), para bactérias e protozoários foi sugerido que estas lectinas têm uma função importante facilitando sua adesão no epitélio intestinal. Para as lectinas de vírus foi sugerido que em humanos elas se ligam a eritrócitos e outras células pelo reconhecimento do ácido *N*-acetil neuramínico presente na superfície celular e que esta ligação é um pré-requisito para o início da infecção (Singh *et al.*, 1999).

As funções das collectinas se referem principalmente à defesa imune inata. As MBL (do inglês: *mannan-binding lectin*), um membro da família collectinas, se ligam a um conjunto de estruturas de carboidratos na superfície celular de microorganismos

(bactéria, vírus, levedura e protozoário parasitário) mediando um efeito antibacteriano, seja pela destruição direta via complemento através de um complexo de ataque da membrana lítica, ou promovendo fagocitose (Ewart *et al.*, 2001; Gadjeva *et al.*, 2001).

1.1.8 Aplicações

A associação de lectinas com carboidratos é um evento primário em alguns processos biológicos tais como, infecção e metástase. Em adição a este papel importante no reconhecimento celular, a interação de lectinas com carboidratos tem sido explorada em vários ramos de pesquisa onde a especificidade sacarídica é essencial (Baszkin *et al.*, 2000). As lectinas são valiosas ferramentas para a investigação estrutural de complexo de carboidrato, especialmente glicoproteínas, e para a análise de mudanças que ocorrem sobre a superfície celular durante os processos fisiológicos e patológicos, desde células normais até células transformadas no câncer (Sharon e Lis, 2001).

As lectinas imobilizadas podem ser utilizadas como matrizes de afinidade para a purificação de várias glicoproteínas, glicolipídeos (ou qualquer amostra que contenha sacarídeo) de grande importância médica como, por exemplo, a purificação de glicoproteínas do vírus HIV (do inglês - *human immunodeficiency vírus*) o qual está sendo bastante utilizado em projetos de desenvolvimento de vacinas (Gilljam, 1993; Bertrand *et al.*, 1998) e também para a purificação de IgA e IgM (Fassina *et al.*, 2001). As lectinas podem ser utilizadas como reagentes na estimulação mitogênica (Barbosa *et al.*, 2001; Macintyre *et al.*, 2001), como ferramenta para a produção dos chamados medicamentos-inteligentes, onde, estes medicamentos diferem-se dos tradicionais por atuarem em células específicas do organismo evitando efeitos colaterais, do tipo provocado pela quimioterapia (Clark *et al.*, 2000; Torchilin *et al.*, 2001; Woodley, 2001). A afinidade de lectinas por glicoproteínas de superfície celular tem sido usada para a identificação de microorganismos como, por exemplo, a *Neisseria gonorrhoeae* que pode ser diferenciada de outras espécies de *Neisseria* (Wu *et al.*, 2000) ou, para identificação de grupos sanguíneos ABO (Matsui *et al.*, 2001).

1.1.9 Purificação

Para a purificação de lectinas em diferentes fontes, tem sido realizada, como primeiro passo, a preparação de extratos com solução salina ou tampão (Kawagishi *et al.*, 2001; Mladenov *et al.*, 2002). Após a extração, muitos extratos com atividade lectínica são submetidos a purificações parciais através de técnicas convencionais para proteínas, incluindo fracionamento salino com sulfato de amônio e diálise exaustiva (Coelho e Da Silva, 2000; Yeasmin *et al.*, 2001). O uso de técnicas cromatográficas é bastante comum para a purificação de lectinas. Dentre estas técnicas, a cromatografia de afinidade é a mais utilizada na purificação, embora, às vezes, seja necessário a utilização de outros métodos cromatográficos para que se possa ter um elevado grau de pureza (Correia e Coelho, 1995; Sampietro *et al.*, 2001). O elevado grau de pureza é estabelecido a partir de parâmetros que, quando analisados em conjunto (eletroforese, cromatografia e outros), vão definir o grau de pureza em que as preparações lectínicas se encontram (Candy *et al.*, 2001; Naeem *et al.*, 2001; Martinez-Cruz *et al.*, 2001).

1.1.10 Isoformas e Isolectinas

Algumas espécies de plantas possuem única ou múltiplas formas moleculares, como, por exemplo, *Vicia villosa*, *Bucos nigra* e *Cratylia mollis* (Coelho e Da Silva, 2000). Estas múltiplas formas moleculares de lectinas presentes em extratos, têm sido chamadas de isolectinas ou isoformas. Isolectinas de acordo com Lis e Sharon (1986b) são definidas como um grupo de proteínas intimamente relacionadas que são originadas a partir da expressão de diferentes genes. Se a heterogeneidade genética não foi definida, o termo isoforma pode ser próprio para formas moleculares de lectinas presentes em uma mesma espécie (Paiva e Coelho, 1992).

1.1.11 *Cratylia mollis*

Popularmente conhecido como feijão camaratu ou camaratuba, a *Cratylia mollis* é uma preciosa forrageira nativa do sertão nordestino, de grande resistência à seca, constituindo um valioso recurso para a alimentação do gado, tanto no período chuvoso como no período de estiagem (Figura 1). Da tribo *Phaseoleae*, subtribo *Dioclineae*, a

qual contém um gênero *Canavalia*, *C. mollis* floresce no período de abril a maio e madurece de julho a agosto produzindo grandes quantidades de sementes com reprodução vigorosa. Em condições naturais observou-se resistência a pragas e doenças. A sua raiz principal enterra-se a prumo no solo, buscando, no subsolo e a grandes profundidades, a quantidade de água que precisa. Se faltar a umidade no subsolo, no período das grandes secas, a camaratuba deixa cair as suas folhas para suspender a respiração e a transpiração, entrando numa espécie de vida latente que se prolonga até que se iniciem os períodos de chuvas. (Silva e De Souza, 1986; Silva, 1992).

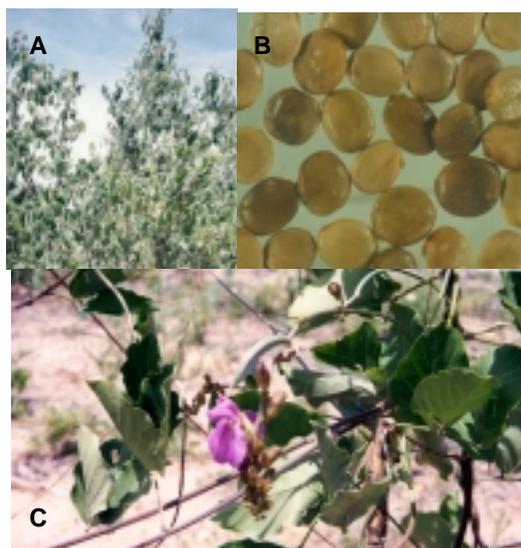


Figura 1: Visão geral da planta. *Cratylia mollis* (A), sementes (B) e sua flor (C).

1.2 ATIVIDADE MITOGÊNICA

1.2.1 Breve Histórico

As lectinas atraíram pouca atenção até os anos 60. Uma descoberta que alterou dramaticamente esta visão foi realizada em 1960 por Peter C. Nowell, na Universidade de Pensilvânia, Filadélfia, que descobriu que a lectina de *Phaseolus vulgaris*, conhecida como fitohemaglutinina (PHA), era mitogênica, ou seja, ela possuía a habilidade de estimular linfócitos a sofrer mitose. Esta descoberta teve um revolucionário impacto sobre a imunologia, pois destruía a visão que se tinha até então, que linfócitos eram células que tinham morte programada e que nem poderiam se dividir nem se diferenciar. Em 1970 foram descobertas mais três lectinas que também possuíam esse mesmo efeito sobre linfócitos: Concanavalina A - Con A (obtida de

Canavalia ensiformis), Pokeweed (obtida de *Phytolacca americana*) e Wisteria (obtida de *Wisteria floribunda*). Em seguida, através de estudos utilizando a Con A, foi descoberto que essa atividade poderia ser inibida por baixas concentrações de monossacarídeos, concluindo desta forma que a estimulação mitogênica está intimamente relacionada com o sítio de ligação a carboidrato da lectina (Lis e Sharon, 1986b; Sharon, 1989; Licastro *et al.*, 1993; Levy-benshimol, 1994).

1.2.2 Métodos Utilizados para Avaliação da Atividade Mitogênica

Existem métodos que são tradicionalmente utilizados, como os métodos radioativos, para medir a proliferação e ativação de linfócitos. Dentre estes o mais utilizado é a incorporação de nucleotídeos radioativos (timidina [^3H]) dentro do DNA, durante a proliferação celular (Barbosa *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002). Outro método bastante utilizado nos dias de hoje, é o método colorimétrico proposto por Mosman (1983), cujo princípio basea-se na redução do brometo de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) em um produto com coloração azul escuro (MTT-formazan) pela enzima mitocondrial tetrazolium-succinato-desidrogenase (Figura 2). A conversão ocorre somente em células viáveis e a quantidade do produto MTT-formazan é proporcional ao número de células vivas presentes (Denizot e Lang, 1986; Hansen *et al.*, 1989; Koike *et al.*, 1999; Mizuno *et al.*, 2000; Toriizuka *et al.*, 2000). Provavelmente, no futuro, um ou mais métodos colorimétricos substituirão os métodos radioativos (Kilpatrick, 1999).

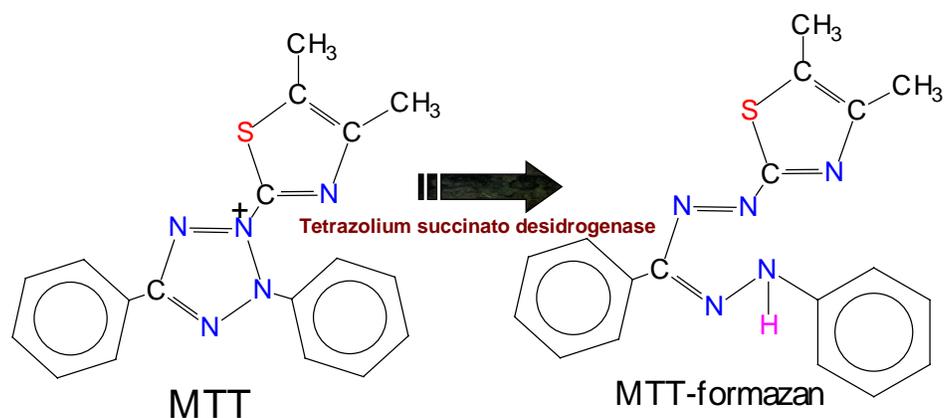


Figura 2: Redução do MTT a MTT-formazan através da enzima tetrazolium-succinato desidrogenase.

1.2.3 Ciclo Celular

O ciclo celular é um conjunto ordenado de eventos que culminam com o crescimento da célula, duplicação do seu material genético e conseqüente divisão. O ciclo celular está dividido em duas fases, interfase e mitose (Alberts *et al.*, 1997b).

Na interfase (Figura 3) a célula está ocupada com a atividade metabólica preparando-se para entrar em mitose. A interfase é composta por três fases:

- ⇒ Fase G₁ (G = *gap* ou lacuna): tempo para o crescimento celular;
- ⇒ Fase S (S = *síntese*): ocorre a duplicação do material genético;
- ⇒ Fase G₂: fornece um intervalo para assegurar que houve uma completa replicação do DNA para então entrar em mitose;
- ⇒ Fase G₀: fase de repouso que tem duração variável.

A mitose (Alberts *et al.*, 1999), fase de divisão celular, é composta por seis etapas (Figura 4) que são:

- ⇒ Prófase: a cromatina começa a condensar tornando-se visível na microscopia ótica;
- ⇒ Prometáfase: quando a membrana nuclear se dissolve cromossomos se ligam aos microtúbulos do fuso por meio de seus cinetócoros e, finalmente, começam a se mover;
- ⇒ Metáfase: as fibras do fuso mitótico alinham os cromossomos de maneira eqüidistante dos pólos do fuso;
- ⇒ Anáfase: as cromátides migram para os pólos opostos;
- ⇒ Telófase: as cromátides são separadas para os lados opostos e uma nova membrana vai se formando ao redor dos núcleos, os cromossomos e as fibras do fuso se dispersam;
- ⇒ Citocinese: as células se dividem em duas células filhas.

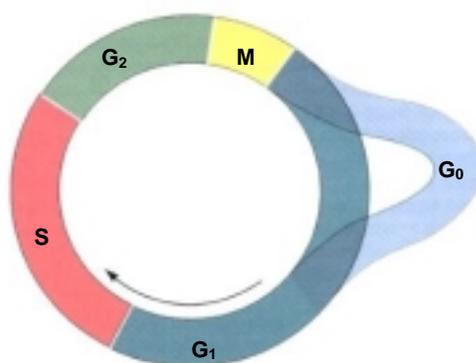


Figura 3: interfase. Fase G₁ (preparo para replicação), fase S (duplicação do DNA), fase G₂ (preparação para a mitose), fase G₀ (fase de repouso). Fonte: Voet e Voet, 1995.

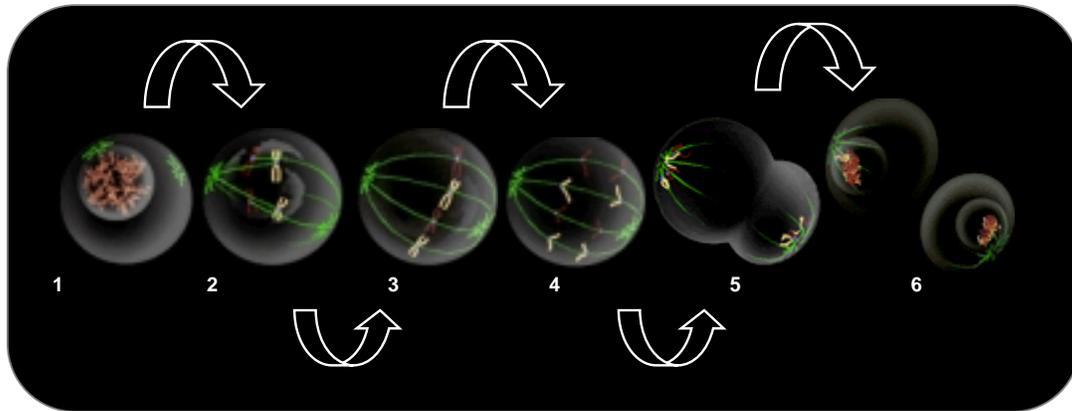


Figura 4: Mitose. Prófase (1), prometáfase (2), metáfase (3), anáfase (4), telófase (5) e citocinese (6).

Fonte: www.biology.arizona.edu/

1.2.4 Mecanismo de Proliferação Celular

Os animais multicelulares necessitam de sinais positivos fornecidos por polipeptídios chamados de *fatores de crescimento* (Tabela 2), que se ligam aos seus receptores de transmembrana com atividade tirosino-quinase estimulando o crescimento e proliferação celular. Quando um fator de crescimento se liga com a porção extracelular do receptor, ocorre a sua dimerização e autofosforilação (da porção intracelular). Uma proteína adaptadora Drk (do inglês: *downstream of receptor kinases*) promove a ligação do receptor ativado à proteína sos, produzida pelo gene sos (do inglês: *Son of Sevenless*) levando à ativação da Ras (Sarcoma de rato, do inglês: *Rat sarcoma*) pela troca do GDP por GTP (Figura 5).

A Ras ativada vai transmitir um sinal através de uma cascata de fosforilações realizadas pelas MAP-quinases (proteínoquinases ativadas por mitógenos) até o núcleo, onde ocorrerá a ativação dos fatores de transcrição. As MAP-quinases ativadas migram para o núcleo e fosforilam tanto o complexo Elk1-SRF, que vai ativar a transcrição do gene fos (do inglês: *Feline osteosarcoma virus*), quanto à proteína jun (do Japonês: *ju-nana*, que significa o número 17) que vai se combinar com a nova proteína fos sintetizada para formar um complexo chamado AP-1, uma proteína reguladora de genes ativa, onde atuará sobre outros genes resultando, na proliferação celular (Figura 5). Atualmente não se sabe a atuação exata da AP-1 na estimulação da proliferação celular (Alberts *et al.*, 1997a).

Tabela 2: Alguns fatores de crescimento e suas ações.

FATOR	AÇÕES
Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)	Estimulam proliferação de células de tecido conjuntivo e algumas células neurogliais
Fator de Crescimento epidérmico (EGF)	Estimulam a proliferação de muitos tipos de células; agem como um sinal indutor no desenvolvimento embrionário
Interleucina-2 (IL-2)	Estimulam a proliferação de linfócitos T ativados
Fator de crescimento de nervos (NGF)	Promovem crescimento e sobrevivência de classes específicas de neurônios
Eritropoetina	Promovem a proliferação, diferenciação e sobrevivência de precursores de eritrócitos

Fonte: Alberts *et al.* (1997a).

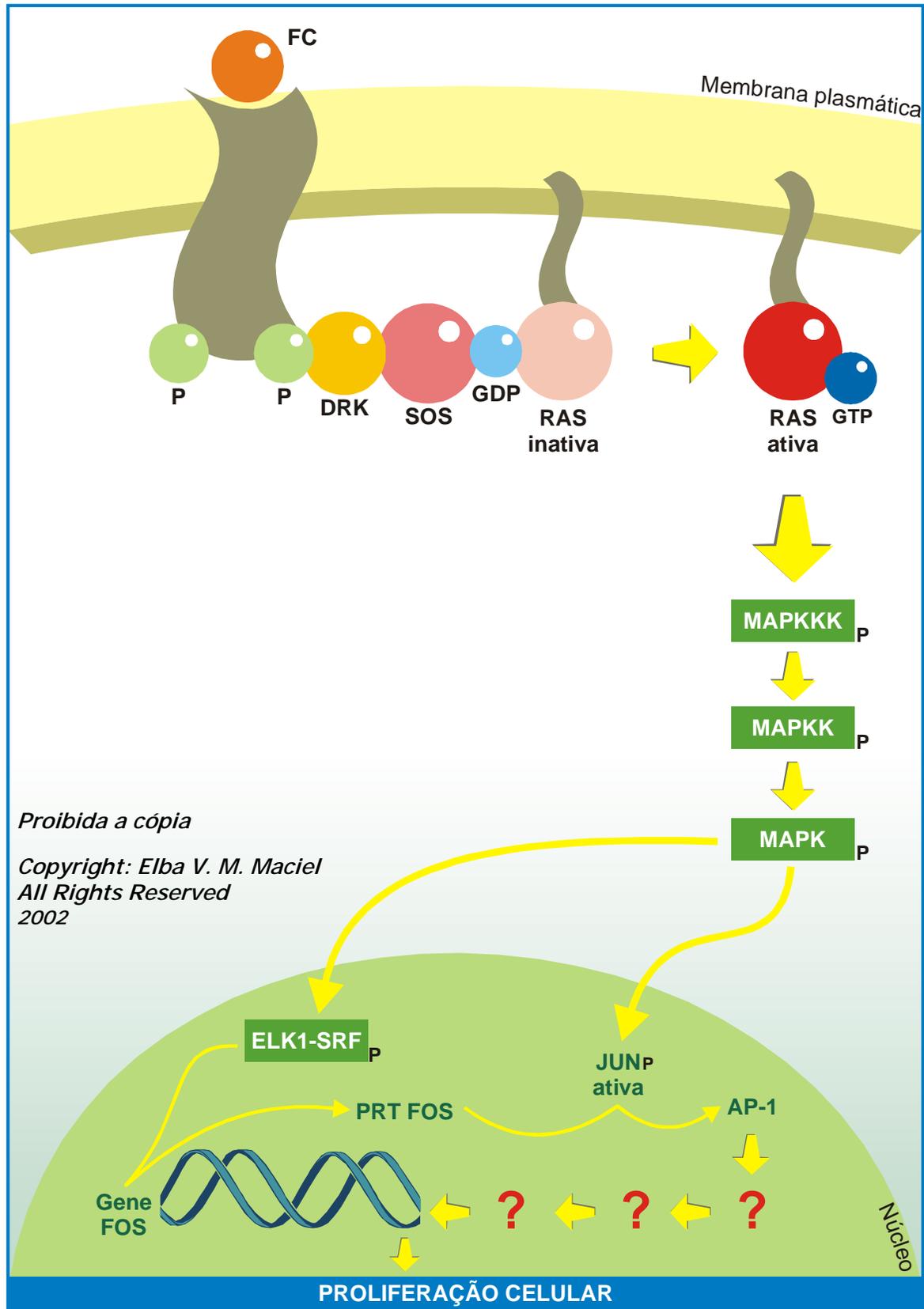


Figura 5: Representação do mecanismo de proliferação celular. FC (Fator de crescimento); P (fosfato); DRK (proteína adaptadora); SOS (proteína sos); GDP (guanidina difosfato); RAS (proteína Ras); GTP (guanidina trifosfato); MAPKs (Proteíno quinases ativadas por mitógenos); ELK1-SRF (complexo de ativação dos genes fos); PRT FOS (proteína fos); JUN (proteína jun); AP-1 (Complexo formado por fos e jun).

1.2.5 Mecanismo de Proliferação de Linfócitos

A indução da proliferação de linfócitos envolve duas fases: a primeira fase, designada ativação celular, é iniciada pela interação do TCR (receptor de células T) com o complexo antígeno-molécula do MHC (Complexo Principal de Histocompatibilidade) sobre as APC (células apresentadoras de antígenos do inglês: *antigen presenting cell*) disparando a transição de G_0 para G_1 bem como a indução da secreção de IL-2 (interleucina-2) e a expressão do seu receptor IL-2R (receptor de interleucina-2). A segunda fase envolve a progressão da fase G_1 para S e mitose, sendo controlada pela interação de IL-2 com IL-2R (Roitt *et al.*, 1999; Stites e Terr, 2000).

Quando ocorre a ligação do complexo antígeno-MHC com o TCR, imediatamente os domínios (associados a proteínas tirosina-quinase) vão se autofosforilar tornando-se ativados para fosforilar uma molécula adaptadora p36 (polipeptídeo pesado, do inglês: *Heavy polypeptide*) que, ativada, se liga a outra proteína adaptadora Grb2 (do inglês - *Growth Factor Receptor-Binding Protein*). A Grb2, por sua vez, vai se ligar à sos (do inglês: *son of sevenless*) formando então um complexo p36-Grb2-sos ativando a Ras. A Ras vai então ativar várias reações de fosforilação em cascata realizadas por MAP-quinases até chegar ao núcleo onde vai ativar o fator de transcrição NF-AT1 (fator nuclear de células ativadas, do inglês: *Nuclear factor of activated T cell*) que por sua vez ativa a transcrição dos genes de IL-2 e IL-2R (Figura 6). Após a ligação da IL-2 com IL-2R ocorrerá uma fosforilação de uma molécula adaptadora Shc (proteína adaptadora) a qual, em seguida, associa-se com a molécula adaptadora Grb2 que vai se ligar com a sos levando à ativação da Ras. Com a ativação da Ras ocorrerá uma série de eventos, ainda não esclarecidos, os quais culminam no crescimento e proliferação celular (Pastor *et al.*, 1995; Thezé *et al.*, 1996; Alberts *et al.*, 1997a).

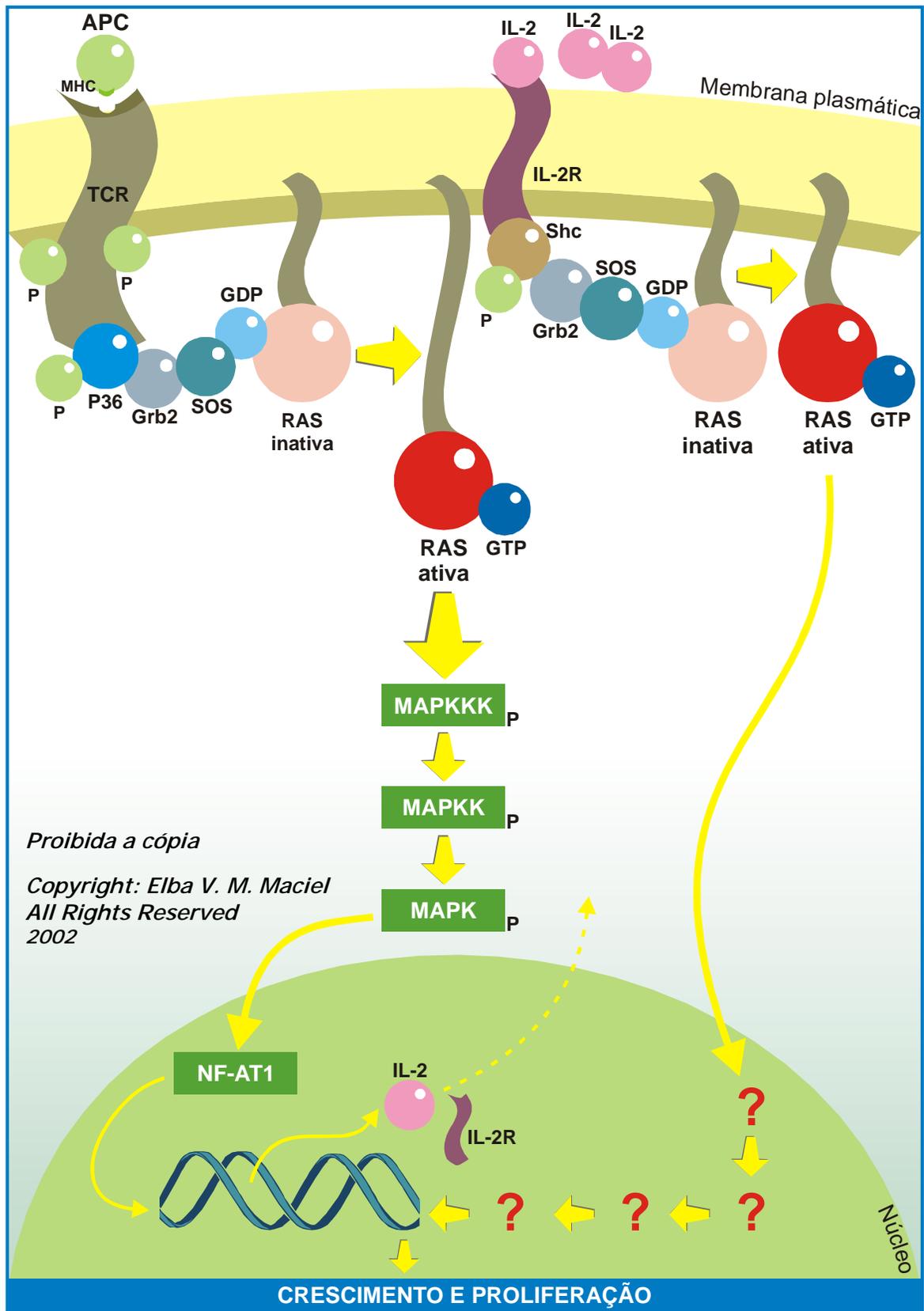


Figura 6: Representação do mecanismo de proliferação de linfócitos. APC (célula apresentadora de antígeno); MHC (complexo principal de histocompatibilidade); TCR (receptor de células T); P (fosfato); P36 (proteína adaptadora); Grb2 (proteína adaptadora); SOS (proteína sos); GDP (guanina difosfato); RAS (proteína Ras); GTP (guanidina trifosfato); MAPKs (Proteíno quinases ativadas por mitógenos); NF-AT1 (fator de transcrição); IL-2 (interleucina 2); IL-2R (receptor de interleucina 2); Shc (proteína adaptadora). 27

1.2.6 Atuação das Lectinas como Mitógenos

A ativação e a proliferação de linfócitos podem ser visualizadas *in vitro* através do cultivo dos linfócitos na presença de agentes ativadores que podem ser anticorpos monoclonais dirigidos contra TCR ou lectinas. As lectinas glicose/manose têm sido utilizadas para avaliar a atividade mitogênica. Uma lectina de sementes da *Parkia speciosa* foi usada para estudar linfócitos de indivíduos saudáveis e pacientes com câncer de esôfago (Suvachittanont e Jaranchavanapet, 2000). Um estudo comparativo com oito lectinas, obtidas de sementes de leguminosas da tribo Diocleae, foi realizado para avaliar a proliferação de linfócitos e produção de γ -interferon (Barral Neto *et al.*, 1992).

As lectinas são capazes de ativar linfócitos através de ligações cruzadas aos TCR, sendo conhecidas como mitógenos (indutores de proliferação). A estimulação dos linfócitos *in vitro* por mitógenos (Figura 7), mimetiza a estimulação específica por antígenos (Roitt *et al.*, 1999). Segundo Kilpatrick (1999), as lectinas podem se ligar a várias glicoproteínas diferentes de superfície, não estando claro, ainda, qual dessas interações é funcionalmente importante. Provavelmente o receptor de célula T seja o receptor mitogênico onde a lectina vai se ligar a porção sacarídica desse receptor através de seus sítios de ligação a carboidrato promovendo a ativação das reações em cascata citadas no item 1.2.5, que resulta na síntese de IL-2 e IL-2R. Após a ligação da IL-2 com IL-2R, como explicado no item anterior, ocorrerá uma fosforilação de uma molécula adaptadora Shc que em seguida associa-se com a molécula adaptadora Grb2 que vai se ligar com a sos levando à ativação da Ras. Com a ativação da Ras ocorrerá uma série de eventos, ainda não esclarecidos, os quais culminam no crescimento, e proliferação celular. As lectinas que não são mitogênicas não promovem a síntese de IL-2 e IL-2R (Kimura e Ersson, 1981; Chilson e Kelly-Chilson, 1989; Kilpatrick, 1999). A ativação da Ras é somente um de uma série eventos complexos de respostas bioquímicas disparadas pelo TCR e IL-2R ativadas.

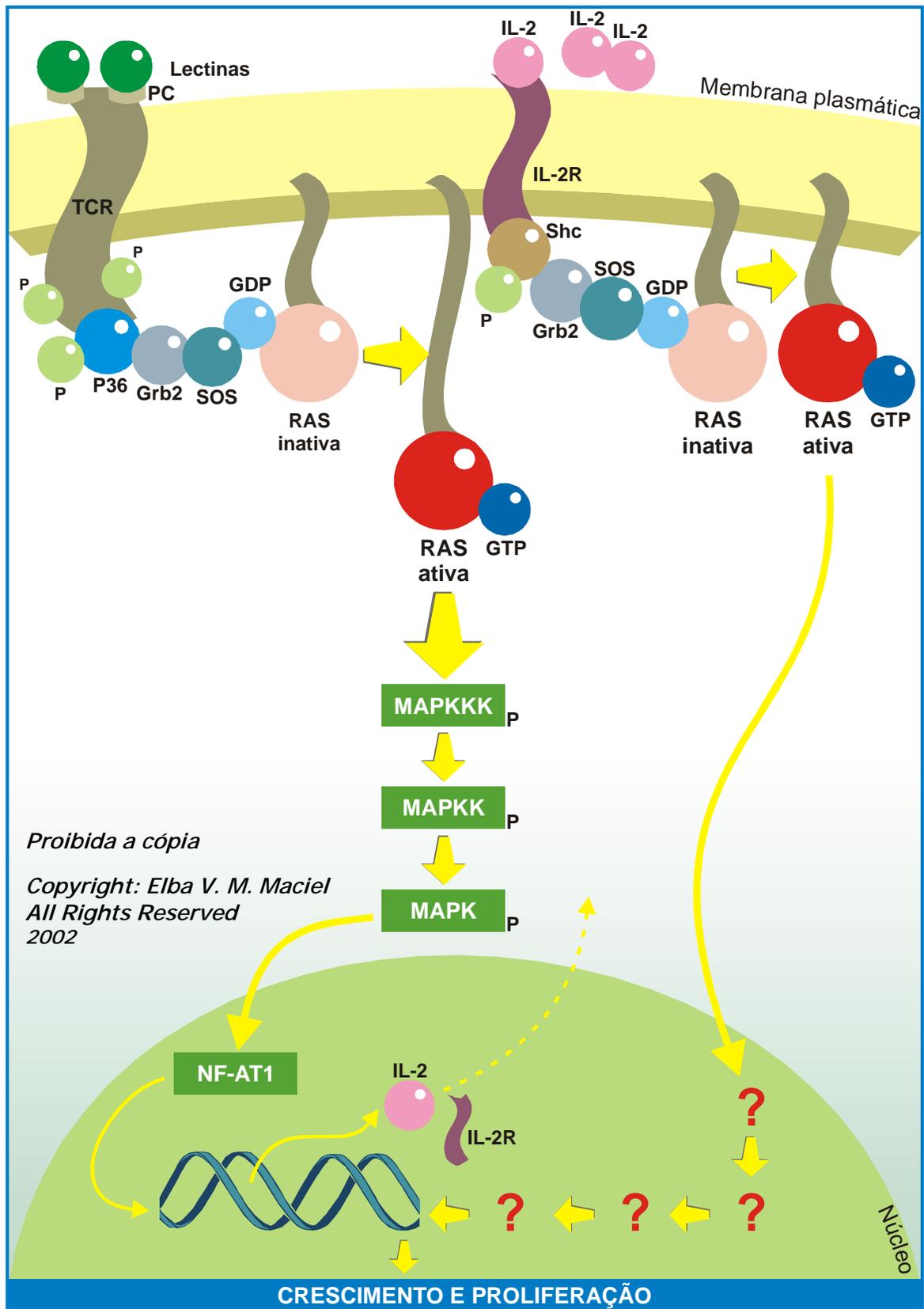


Figura 7: Representação do mecanismo de proliferação de linfócitos por lectinas. PC (porção carboidrato); TCR (receptor de células T); P (fosfato); P36 (proteína adaptadora); Grb2 (proteína adaptadora); SOS (proteína sos); GDP (guanina difosfato); RAS (proteína Ras); GTP (guanidina trifosfato); MAPKs (Proteína quinases ativadas por mitógenos); NF-AT1 (fator de transcrição); IL-2 (interleucina 2); IL-2R (receptor de interleucina 2); Shc (proteína adaptadora).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Neste trabalho, nos propomos a analisar a atividade mitogênica em preparações da lectina de *Cratylia mollis* em linfócitos humanos de doadores saudáveis através de um método colorimétrico utilizando o MTT.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ⇒ Obter preparações da lectina de sementes de *C. mollis* (Cra-Sephadex e Cra Iso 1);
- ⇒ Determinar uma faixa de concentrações em que as lectinas apresentam maior atividade mitogênica;
- ⇒ Comparar as lectinas de sementes de *Canavalia ensiformis* (Concanavalina A, Con A) e de sementes de *Phaseolus vulgaris* (PHA) com as da *Cratylia mollis*;
- ⇒ Determinar a concentração de carboidrato que melhor inibe a atividade mitogênica.

3 RELEVÂNCIA DO TRABALHO

O laboratório de Glicoproteínas do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco tem como propósito desde 1983, a obtenção de um painel de lectinas e formas moleculares de lectinas puras, a partir de espécies autóctones ou introduzidas (Cavalcanti & Coelho, 1990; Paiva & Coelho, 1992; Antunes e Coelho, 1994; Correia e Coelho, 1995; Coelho e Da Silva, 2000). As referidas lectinas, de diferentes especificidades ou de similar reconhecimento de carboidratos, devidamente caracterizadas, podem servir aos mais diversos propósitos. A importância da determinação da atividade mitogênica da lectina de sementes de *C. mollis* é oferecer mais uma ferramenta para o estudo da ativação e controle de linfócitos. A lectina é extraída de uma planta forrageira do sertão nordestino, sendo de fácil purificação e elevado rendimento. As vantagens do método colorimétrico utilizado neste estudo sobre os métodos radioativos tradicionais é que, o primeiro permite a análise de um número maior de amostras, possui um custo mais baixo além de oferecer mais segurança ao analisador (Denizot e Lang, 1986; Mosmoan, 1983; Kilpatrick, 1999).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997a. p. 721-785, cap. 15.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. **Biologia molecular da célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997b. p. 863-910, cap.17.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da biologia celular**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 1999. p. 561-583, cap.17.

ANTUNES, R. V.; COELHO, L. C. B. B. Identification of lectin activity in the hemolymph of *castnia-licus drury*, a sugarcane giant borer (lepidoptera-castniidae). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, p. 33-37, 1994.

BABA, K.; OGAWA, M.; NAGANO, A.; KURODA, H.; SUMIYA, K. Developmental changes in the bark lectins of *Sophora japonica*. **Planta**, v. 181, p. 462-470, 1991.

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

BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B.; GRANGEIRO, T. B.; DE FREITAS, L. A. R.; BARRAL-NETO, M. *In vivo* lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 673-678, 2001.

BERTRAND, O.; COCHET, S.; CARTRON, J. P. Expanded bed chromatography for one-step purification of mannose binding lectin from tulip bulbs using mannose immobilized on DEAE streamline. **Journal of Chromatography A**, v. 822, p. 19-28, 1998.

CANDY, L.; PEUMANS, W. J.; MENU-BOUAOUICHE, L.; ASTOUL, C. H.; VAN DAMME, J.; VAN DAMME, E. J. M.; ERARD, M.; ROUGÉ, P. The gal/galNAc-specific lectin from the plant pathogenic basidiomycete *Rhizoctonia solani* is a member of the ricin-B family. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, p. 655-661, 2001.

CAVADA, B. S.; SANTOS, C. F.; GRANGEIRO, T. B.; NUNES, E. P.; SALES, P. V. P.; RAMOS, R. L.; DE SOUZA, F. A. M.; CRISOSTOMO, C. V.; CALVETE, J. J. Purification and characterization of a lectin from seeds of *vatairea macrocarpa* Duke. **Phytochemistry**, v. 49, p. 675-680, 1998.

CAVADA, B. S.; MADEIRA, S. V. F.; CALVETE, J. J.; SOUZA, L. A.; BOMFIM, L. R.; DANTAS, A. R.; LOPES, M. C.; GRANGEIRO, T. B.; FREITAS, B. T.; PINTO, V. P.; LEITE, K. B.; RAMOS, M. V. Purification, chemical, and immunochemical properties of a new lectin from Mimosoideae (*Parkia discolor*). **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 30, p. 271-280, 2000.

CAVALCANTI, M. S. M.; ALMEIDA, A. M. P.; COELHO, L. C. B. B. Interaction of lectins with *Yersinia pestis* strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 26, p. 125-131, 1990.

CHILSON, O. P.; KELLY-CHILSON, A. E. Mitogenic lectins bind to the antigen receptor on human lymphocytes. **European Journal of Immunology**, v. 19, p. 289-296, 1989.

CLARK, M. A.; HIRST, B. H.; JEPSON, M. A. Lectin-mediated mucosal delivery of drugs and microparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 43, p. 207-223, 2000.

COELHO, L. C. B. B.; DA SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 295-300, 2000.

CORREIA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B. Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds, of *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 55, p. 261-273, 1995.

COUTIÑO-RODRÍGUEZ, R.; HERNÁNDEZ-CRUZ, P.; GILES-RÍOS, H. Lectins in fruits having gastrointestinal activity: Their participation in the hemagglutinating property of *Escherichia coli* 0157:H7. **Archives of Medical Research**, v. 32, p. 251-257, 2001.

DENIZOT F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, p. 271-277, 1986.

ELGAVISH, S.; SHAANAN, B. Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, p. 462-467, 1997.

EWART, K. V.; JOHNSON, S. C.; ROSS, N. W. Lectins of the innate immune system and their relevance to fish health. **Journal of Marine Science**, v. 58, p. 380-385, 2001.

FASSINA, G.; RUVO, M.; PALOMBO, G.; VERDOLIVA, A.; MARINO, M. Novel ligands for affinity-chromatographic purification of antibodies. **Journal Biochemical and Biophysical Methods**, v. 49, p. 481-490, 2001.

GABOR, F.; KLAUSEGGER, U.; WIRTH, M. The interaction between wheat germ agglutinin and other plant lectins with prostate cancer cells Du-145. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, p. 35-47, 2001.

GADJEVA, M.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C. The mannan-binding-lectin pathway of the innate immune response. **Current Opinion in Immunology**, v. 13, p. 74-78, 2001.

GILLJAM, G. Envelope glycoproteins of HIV-1, HIV-2, and SIV purified with *Galanthus nivalis* agglutinin induce strong immune responses. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 9, p. 431-438, 1993.

HANSEN, M. B.; NEILSEN, S. E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **Journal of Immunological Methods**, v. 119, p. 203-210, 1989.

HONG, M.; CASSELY, A.; MECHREF, Y.; NOVOTNY, M. V. Sugar-lectin interactions investigated through affinity capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v. 752, p. 207-216, 2001.

KABIR, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed-derived lectin of versatile applications in immunobiological research. **Journal of Immunological Methods**, v. 212, p. 193-211, 1998.

KAWAGISHI, H.; TAKAGI, J.; TAIRA, T.; MURATA, T.; USUI, T. Purification and characterization of a lectin from the mushroom *Mycophlebotomoides aitchisonii*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 53-58, 2001.

KENNEDY, J. F.; PAIVA, P. M. G.; CORREIA, M. T. S.; CAVALCANTE, M. S. M.; COELHO, L. C. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polimers**, v. 26, p. 219-230, 1995.

KILPATRICK, D. C. Mechanisms and assessment of mitogenesis. In: RHODES, J. M.; MILTON, J. D. **Lectins Methods and Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 1999. p. 365-378.

KIMURA, A.; ERSSON, B. Activation of lymphocytes-t by lectins and carbohydrate-oxidizing reagents viewed as an immunological recognition of cell-surface modifications seen in the context of self major histocompatibility complex antigens. **European Journal of Immunology**, v. 11, p. 475-783, 1981.

KOIKE, T.; BEPPU, H.; KUZUYA, H.; MARUTA, K.; SHIMPO, K.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; FUJITA, K. A 35 kDa mannose-binding lectin with hemagglutinating and mitogenic activities from "Kidachi Aloe" (*Aloe arborescens* Miller var. *natalensis* Berger). **Journal of Biochemistry**, v. 118, p. 1205-1210, 1995.

LEVY-BENSHIMOL, A. Las lectinas: el juego nunca se termina. **Acta Científica Venezolana**, v. 45, p. 5-12, 1994.

LICASTRO, F.; MORINI, M. C.; KRETZ, O.; DIRHEIMER, G.; CREPPY, E. E.; STIRPE, F. Mitogenic activity and immunological properties of bolesantine, a lectin isolated from the mushroom *Boletus satanas* Lenz. **International Journal of Biochemistry**, v. 25, p. 789-792, 1993.

LIS, H.; SHARON, N. Biological properties of lectins. In: **The Lectins: Properties Functions, and Applications in Biology and Medicine**. London: Academic Press, 1986a. p. 265-285.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins as molecules and as tools. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, p. 35-67, 1986b.

MACHUKA, J. S.; OKEOLA, O. G.; VAN DAMME, E. J. M.; CHRISPEELS, M. J.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W. J. Isolation and partial characterisation of galactose-specific lectins from African Yam beans, *Sphenostyles stenocarpa* Harms. **Phytochemistry**, v. 51, p. 721-728, 1999.

MACINTYRE, A. R.; DIXON, J. B.; GREEN, J. R. Mitosis and differentiation in T-cells under cytotoxic action of *Echinococcus granulosus* hydatid fluid. **Veterinary Parasitology**, v. 96, p. 277-289, 2001.

MARTÍNEZ-CRUZ, M; ZENTENO, E.; CÓRDOBA, F. Purification and characterization of a galactose-specific lectin from corn (*Zea mays*) coleoptyle. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1568, p. 37-44, 2001.

MATSUI, T.; HAMAKO, J.; OZEKI, Y.; TITANI, K. Comparative study of blood group-recognizing lectins toward ABO blood group antigens on neoglycoproteins, glycoproteins and complex-type oligosaccharides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1525, p. 50-57, 2001.

MIZUNO, M.; SHIOMI, Y.; MINATO, K.; KAWAKAMI, S.; ASHIDA, H.; TSUCHIDA, H. Fucogalactan isolated from *Sarcodon aspratus* elicits release of tumor necrosis factor- α and nitric oxide from murine macrophages. **Immunopharmacology**, v. 46, p. 113-121, 2000.

MLADENOV, I. V.; HARALAMBIEVA, I. H.; IANKO, I. D.; MITOV, I. G. Characterization of 20-kDa lectin-spermagglutinin from *Arum maculatum* that prevents *Chlamydia pneumoniae* infection of L-929 fibroblast cells. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 1386, p. 1-6, 2002.

MO, H; WINTER, H C.; GOLDSTEIN, I J. Purification and characterization of a Neu5Acalpha2-6Galbeta1-4Glc/GlcNAc-specific lectin from the fruiting body of the polypore mushroom *Polyporus squamosus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 10623-10629, 2000.

MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S.; DE OLIVEIRA, J. T. A.; AINOUS, I. L. Lectinas de Plantas. In: **Proceedings of the First Brazilian Congress on Proteins**. São Paulo: Editora da Unicamp, 1991. p. 71-96.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NAEEM, A.; HASAN, K. H.; VLKRAM, H.; AKLF, M. Purification of cajanus cajan root lectin and its interaction with rhizobial lipopolysaccharide as studied by different spectroscopic techniques. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 396, p. 99-105, 2001.

NG, T. B.; YU, Y. L. Isolation of a novel heterodimeric agglutinin from rhizomes of *Smilax glabra*, the Chinese medicinal material tufuling. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, p. 269-277, 2001.

NOMURA, K.; ASHIDA, H.; UEMURA, N.; KUSHIBE, S.; OZAKI, T.; YOSHIDA, M. Purification and characterization of a mannose/glucose-specific lectin from *Castanea crenata*. **Phytochemistry**, V. 49, p. 667-673, 1998.

PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B. Purification and partial characterization of two lectin isoforms from *Cratylia mollis* Mart (camaratu bean). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 36, p. 113-118, 1992.

PASTOR, M. I.; REIF, K.; CANTRELL, D. The regulation and function of p21^{ras} during T-cell activation and growth. **Immunology Today**, v. 16, p. 159-164, 1995.

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

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Classification of plant lectins in families of structural and evolutionary related proteins. In: **The molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2**, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2001, p. 27-54.

RABINOVICH, G. A.; RIERA, C. M.; SOTOMAYOR, C. E. Galectin-1, an alternative signal for T cell death, is increased in activated macrophages. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 557-567, 1999.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. Interaction of a mulberry leaf lectin with a phytopathogenic bacterium, *P. syringae pv mori*. **Plant Science**, v. 160, p. 739-744, 2001.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**, 5. ed. São Paulo: Manole, 1999. p. 13-23, cap. 20.

RÜDIGER, H. Plant lectins-More than just tools for glycoscientists: Occurrence, structure, and possible functions of plant lectins. **Acta Anatomica**, v. 161, p. 130-152, 1998.

SACCHETTINI, J C; BAUM, L G; BREWER, C F. Multivalent protein-carbohydrate interactions. A new paradigm for supermolecular assembly and signal transduction. **Biochemistry**, v. 40, p 3009-3015, 2001.

SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J. Isolation and characterization of the lectin from the green marine alga *Ulva lactuca*. **Botanica Marina**, v. 41, p. 427-433, 1998.

SAMPIETRO, A. R.; ISLÃ, M. I.; QUIROGA, E. N.; VATTUONE, M. A. An N-acetylglucosamine oligomer binding agglutinin (lectin) from ripe *Cyphomandra betacea* Sendt. Fruits. **Plant Science**, v. 160, p. 659-667, 2001.

SATO, Y.; MURAKAMI, M.; MIYAZAWA, K.; HORI, K. Purification and characterization of a novel lectin from a freshwater cyanobacterium, *Oscillatoria agardhii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 125, p. 169-177, 2000.

SHARON, N. A centenary of lectins: impact on immunology. In: **Cellular Basis of Immune Modulation**. London: Alan R. Liss, 1989. p. 609-619.

SHARON, N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 18, p. 221-226, 1993.

SHARON, N.; LIS, H. The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. In: WU, A. M. **The molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2**. Taiwan: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2001. p. 1-9.

SHANGARY, S.; SING, J. S. S.; KAMBOJ, K. K. K.; SANDHU, R. S. Purification and properties of four monocot lectins from the family Araceae. **Phytochemistry**, v. 40, p. 449-454, 1995.

SILVA, C. M. M. S.; DE SOUZA, S. M. Como produzir mudas de camaratuba. **Comunicado Técnico-EMBRAPA**, n. 16, p. 1-2, 1986.

SILVA, C. M. M. S. Avaliação da camaratuba no semi-árido Nordeste. **Boletim de Pesquisa-EMBRAPA**, n. 43, p. 1-19, 1992.

SINGH, R. S.; TIWARY, A. K.; KENNEDY, J. F. Lectins: Sources, and applications. **Critical Reviews in Biotechnonoly**, v.19, p. 145-178, 1999.

SOUZA, S. R.; CORREIA, M. T. S.; PESSOA, M. A. M.; KENNEDY, J. F.; LIMA, J. L.; COELHO, L. C. B. B. A novel model to characterize the double electric layer of lectin

from *Cratylia mollis* (Camaratu bean) and *Canavalia ensiformis* in metallic surface. **Carbohydrate Polymers**, v. 46, p. 191-193, 2001.

STITES, D. P.; TERR, A. I. **Imunologia básica**. Rio de Janeiro: Prentice/Hall do Brasil, 1992.p. 47-56. cap. 5.

SUN, J. Z.; WANG, K. Y. Separation and characterization of the two chains of *Trichosanthes kirilowii* isolectin I. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 27, p. 233-239, 1995.

SUVACHITTANONT, W.; JARANCHAVANAPET, P. Mitogenic effect of *Parkia speciosa* seed lectin on human lymphocytes. **Planta Médica**, v. 66, p. 699-704, 2000.

THÈZE, J.; ALZARI, P. M.; BERTOGLIO, J. Interleukin 2 and its receptores: recent advances and new immunological functions. **Immunology Today**, v. 17, p. 481-486, 1996.

TORCHILIN, V. P.; LEVCHENKO, T. S.; LUKYANOV, A. N.; KHAW, B. A.; KLIBANOV, A. L.; RAMMOHAN, R.; SAMOKHIN, G. P.; WHITEMAN, K. R. *p*-Nitrophenylcarbonyl-PEG-PE-liposomes: fast and simple attachment of specific ligands, including monoclonal antibodies, to distal ends of PEG chains via *p*-nitrophenylcarbonyl groups. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1511, p. 397-411, 2001.

TORIIZUKA, K.; HOU, P. H.; YABA, T.; LIJIMA, K.; HANAWA, T.; CYONG, J. C. Effects of Kampo medicine, Toki-shakuyaku-san (Tang-Kuei-Shao-Yao-San), on choline acetyltransferase activity and norepinephrine contents in brain regions, and mitogenic activity of splenic lymphocytes in ovariectomized mice. **Journal Ethno-Pharmacology**, v. 71, p. 133-143, 2000.

VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; ROUGÉ, P.; PEUMANS, W. Molecular cloning of the bark and seed lectins from the Japanese pagoda tree (*Sophora japonica*). **Plant Molecular Biology**, v. 33, p. 523-536, 1997.

VAN DAMME, E. J. M.; BARRE, A.; ROUGÉ, P.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W. J. Characterization and molecular cloning of *Sambucus nigra* agglutinin V (nigra b), a

GalNAc-specific type-2 ribosome-inactivating protein from the bark of elderberry (*Sambucus nigra*). **European Journal Biochemistry**, v. 237, p. 505-513, 1996.

VIJAYAN, M.; CHANDRA, N. Lectins. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, p. 707-714, 1999.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. 2. ed. Toronto, Singapore: John Willy & Sons, 1995. p. 1207-1234/1280-1286, cap. 34

WANG, H.; NG, T. B.; LIU, Q. Isolation of a new heterodimeric lectin with mitogenic activity from fruiting bodies of the mushroom *Agrocybe cylindracea*. **Life Science**, v. 70, p. 877-885, 2002.

WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D.; SAKULBORIRUG, C. A lectin from the bark of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). **Phytochemistry**, v. 47, p. 183-187, 1998.

WOODLEY, J. Bioadhesion: New possibilities for drug administration?. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 40, p. 77-84, 2001.

WU, A. M.; WU, J. H.; TSAI, M. S.; HERP, A. Carbohydrate specificity of na agglutinin isolated from the root of *Trichosanthes kirilowii*. **Life Sciences**, v. 66, p. 2571-2581, 2000.

YEASMIN, T.; TANG, M. A.; RAZZAQUE, A.; ABSAR, N. Purification and characterization of three galactose specific lectins from mulberry seeds (*Morus* sp). **European Journal of Biochemistry**, v. 268, p. 6005-6010, 2001.

5 ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO PLANTA MÉDICA

MITOGENIC ACTIVITY OF *Cratylia mollis* LECTINS ON HUMAN LYMPHOCYTES

Elba Verônica Matoso Maciel, Vanduir S. Araújo Filho, Mineo Nakazawa, Yara de
Miranda Gomes, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho, Maria Tereza dos
Santos Correia

Mitogenic Activity of *Cratylia mollis* Lectins on Human Lymphocytes

Maciel, E. V. M.¹; Araújo-Filho, V. S.¹; Nakazawa, M.²; Gomes, Y. M.²; Coelho, L. C. B. B.¹ & Correia, M. T. S.^{1*}

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica, Cidade Universitária, Recife-PE-Brasil 50670-901.

² Laboratório de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães–Fiocruz, Departamento de Imunologia, laboratório de Imunoparasitologia, Cidade Universitária, Recife PE - Brasil 50670-910.

The mitogenic effect of *Cratylia mollis* purified lectins (Cra-Sephadex and Cra-Iso 1) on human lymphocytes was analyzed through a colorimetric assay using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT). *C. Mollis* seed preparations showed mitogenic activity and this activity is comparable to those of the well known T-cell mitogens, concanavalin A (Con A) and phytohaemagglutinin (PHA). Inhibition of lymphocyte proliferation with methyl α -D-mannoside was observed and indicated that the mitogenic effect involved lectin binding site.

Keywords: Lectin / *Cratylia mollis* / MTT / Mitogenic activity/ Lymphocyte proliferation

Corresponding author: Tel.: (+55-81) 3271-8540; Fax: (+55-81) 3271-8576.

E-mail address: mcorreia@npd.ufpe.br (Correia, M.T.S.)

Introduction

Lectins are proteins or glycoproteins, which have the ability to bind selectively free or conjugated oligosaccharides in a reversible way by two or more binding sites (1). These proteins are broadly spread in nature and at the plant kingdom legume seeds are the major source of lectins; they are also abundant in many vegetable tissues such as roots, leaves, stems, fruits and

even barks (2). Mitogenic lectins are useful as reagents, and the study of their interactions with mononuclear cells *in vitro* has been invaluable to understand lymphocyte activation and its control (3). Lectins are capable of activate lymphocytes through T cell receptor (TCR) cross binding. Probably, the TCR saccharide portion is the specific lectin binding site, promoting the activation and consequently proliferation of the lymphocytes (4). There are also lectins which do not own the capacity of proliferating lymphocytes such as *Cyphomandra betacea* lectin (5). The cellular proliferation can be evaluated through a colorimetric method, firstly proposed by Mosman (6). In this process occurs a reduction of tetrazolium salt, 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium (MTT) in a product with a dark blue coloration (formazan) by the mitochondrial enzyme succinate-dehydrogenase in visible cells.

Cratylia mollis seed lectins (Cra), of mannose/glucose recognition, has been highly purified and characterized (7). Cra is structurally similar to Concanavalin A (Con A), a well-characterized lectin from the seeds of *Canavalia ensiformis* (8). In the present work, Cra lectins were used as a tool to evaluate the cellular proliferation of human lymphocytes through the MTT colorimetric assay; the mitogenic effect was carbohydrate inhibited.

Materials and Methods

Lectin Preparation

Seeds of *C. mollis* (tribe *Diocleae*) were collected in the State of Pernambuco (Brazil) and the lectins (Cra-Sephadex and Iso 1) were purified according to Correia and Coelho (7). The seed extract [10% (w/v) seed extract in 0.15 M NaCl] was ammonium sulphate fractionated (40-60 %) followed by affinity chromatography on a Sephadex G-75 column (Cra Sephadex). This material was then submitted to ion exchange chromatography on a CM-cellulose column (Cra Iso1). Con A and the lectin from phytohaemagglutinin (PHA) were purchased from Sigma. The protein concentration was determined according to Bradford (9).

Lymphocyte Stimulation Assay

The lymphocytes were obtained from heparinized venous blood over a Histopaque gradient (Sigma Chem. Comp.) according to the manufacture's instructions. Lymphocyte band (at the interface) was carefully removed and washed in RPMI 1640 medium (Sigma) supplemented with 10% fetal calf serum (v/v), 1% sodium pyruvate (w/v), 0.002 M L-Glutamine, 100 UI/ml penicillin and 100 µg/ml of streptomycin (complete medium). The cells were adjusted to 2×10^5 cells/well with the same medium.

The assay was performed in tissue culture plates (96 wells). Initially, the wells were fulfilled with complete medium followed by lectins (0.78 to 100 µg/ml) and lymphocytes (2×10^5 cells/well). The plates were incubated at 37°C with CO₂ at 5% for 24, 48 or 72 h. Control with lymphocytes at absence of lectins and blank with complete medium were performed. After the incubation, MTT solution (5 mg/ml in RPMI 1640 medium) filtered in millipore (0.22 µm) was added and incubated (4 h) at the same condition. The plates were centrifuged (500 x g, 10 min), supernatant was removed and 100 µl of dimethyl sulphoxide, DMSO (Sigma), was added with agitation until all the formazan crystals were dissolved. The plates were read at 600 nm (Bio-Rad model 2550). The stimulant effect was expressed as a proliferation index (PI): ratio of MTT-formazan production in the presence and absence of lectins. The ratio of absorbance was established in the absence (PI=1.0) and presence of lectin mitogenic samples (PI higher than 1.0). The inhibition assay was performed by the previous incubation of Cra preparations (50 µl) with 50 µl of methyl α-D-mannoside (25, 50 and 100 mM) solution in complete medium, for 20 min. The following controls were used: carbohydrate in lectin absence and lymphocyte presence; lymphocyte and complete medium; and lectin in lymphocyte presence. Total inhibition (PI 1.0) was obtained in the presence of carbohydrate and lectin. At each concentration of lectins, cell cultures in three wells were used as triplicates.

Results

Cra lectins preparations stimulated human lymphocyte proliferation and the optimum concentration of the lectins varied depending on individual donors (figure 1). There was no difference between 48 or 72 h of incubation; 24 h did not induce sufficient proliferation to be used. All donors produced a positive response to the lectins (0.78-100 $\mu\text{g/ml}$); however, the concentration of the maximum activity varied among individuals. The better donor (1) and 48 h of incubation were used to the subsequent assays.

All lectins showed mitogenic activity at all tested concentrations when donor 1 was used (figure 2A). The maximum activity obtained (6.25 $\mu\text{g/ml}$) showed a significantly distinct PI in relation to lectin absence (figure 2B). PHA was used as a positive control and had a PI (2.9) higher than the other lectins; no significant differences were observed between Con A and Cra lectins.

Methyl α -D-mannoside did not show any effect on lymphocyte proliferation at the tested concentrations. The assay revealed a different result in relation to carbohydrate concentration when the same donor was tested nine months later. The better concentration (12.5 $\mu\text{g/ml}$) was used to the inhibition assay. Cra Sephadex mitogenic activity was partially (25 mM) or totally inhibited by methyl α -D-mannoside (50 and 100 mM); Cra Iso 1 activity was inhibited by all tested carbohydrate concentrations (figure 3).

Discussion

Mitogenic activity of *C. mollis* offer one more tool for the study of control and lymphocyte activation. These lectins are obtained from a forege plant very common in the semiarid region of the northeast of Brazil, being of easy purification and high yield.

This distinct mitogenic response for some individuals could be explained by the presence of enzymes involved in carbohydrate removal from cell surface. The presence of distinct levels of

α -mannosidase activity, in lymphocytes and blood plasma, may be responsible for different levels of lymphocyte responsiveness from various donors (10). The fact that different subpopulations (11) and accessory cells (12) are present in each individual donor could mean that they need to be stimulated differently (10). Some lectins (e.g. wheat germ agglutinin or Datura lectin) may be mitogenic or nonmitogenic, depending on the lectin concentration used. An individual lectin may bind to several glycoproteins on the lymphocyte surface, resulting in interactions that may or may not be functionally relevant, and that could have opposing effects (3). Mitogenic activity was evaluated under the most rigorous criteria. The results obtained to *C. mollis* lectins were similar to those obtained to *P. speciosa* lectin, suggesting that the mitogenic activity mediated by lectin is donor dependent.

Nine lectins from the tribe *Dioclea*, including Con A, are structurally similar to Cra Iso 1 and Cra Sephadex; the latter preparation contains two molecular forms (Iso) of Cra, Cra Iso 1 and Cra Iso 4. Glucose/mannose specific lectins obtained from seeds of the same tribe (*Dioclea*) had similar structures but were distinct in their ability to stimulate human lymphocytes. The subtle differences on the mitogenic activity of these lectins may be explained by a combination of diverse isoforms (molecular forms) that they present. Another possibility was attributed to small differences in their aminoacid sequence in the region involved with sugar interaction that may affect the fine specificity for sugar in the cell membrane (13).

Cra Iso 1 and Cra Sephadex were not significantly different on mitogenic activity; however, a distinct inhibition pattern was observed. The whole *Lathyrus ochrus* lectin (molecular forms) showed a higher PI than the two separated isolectins (*L. ochrus* I and II); the mixture of the two isolectins, which is represented by the whole lectin, could have a synergetic effect on the lymphoid cells (14). The PI for Cra sephadex and Cra Iso 1 was similar to Con A, but lower to PHA.

Cra lectins (PI) were inhibited by the specific carbohydrate and the inhibition was dose dependent. Mitogenic lectins bind to lymphocytes via carbohydrate receptors on the lymphocyte

cell surface; alterations of cell saccharides and subsequent lectin binding are expected to occur when lymphoid cells differentiate or are transformed (15), (16). Differences on mitogenic activity mediated by lectins could be used to obtain preferential stimulation of cell or to distinguish malignant cells from their non-malignant forms by the mitogenic activity (15). Cra Sephadex was used as a marker to differentiate normal mammary tissue from malignant breast tumor (17).

The colorimetric method showed to be sensitive and similar to those obtained to other lectins, including Con A and PHA, when the traditional radioactive methods were used (18). The colorimetric assay is rapid, with significant advantages over traditional techniques such as several commonly used proliferation assays (19). Cra (Cra Sephadex and Cra Iso 1) constitute another glucose/mannose lectin available for the evaluation of lymphocyte activation.

References

- ¹ Sharon N, Lis H, The structural basis for carbohydrate recognition by lectins. In: Wu AM. Editors. The Molecular Immunology of Complex Carbohydrates-2. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2001: 1-9.
- ² Coelho LCBB, Silva MBR, Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. Phytochem. Analysis 2000: 11: 295-300.
- ³ Kilpatrick, D.C., Mechanisms and assessment of mitogenesis. In: Rhodes, J.M., Milton J.D. (Eds.), Lectins Methods and Protocols. Humana Press, Totowa-NJ, 1999: 365-378.
- ⁴ Pastor MI, Reif K, Cantrell D, The regulation and function of p21^{ras} during T-cell activation and growth. Immunol Today, 1995: 16: 159-164.
- ⁵ Sampietro AR, Isla MI., Quiroga EN, Vattuone MA, An N-acetylglucosamine oligomer binding agglutinin (lectin) from ripe *Cyphomandra betacea* Sendt. Fruits. Plant Science 2001:160: 659-667.
- ⁶ Mosman T, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods, 1983: 65: 55-63.
- ⁷ Correia MTS, Coelho LCBB, Purification of a glucose/mannose specific lectin, isoform 1, from seeds of *Cratylia mollis* Mart. (camaratu bean). Appl. Biochem. Biotech, 1995: 55: 261-273.
- ⁸ Naismith JH, Habash J, Harrop S, Helliwell JR, Hunter WN, Wan TCM, Weisgerber S, Karlb AJ, Yariv J, Refined structure of cadmium-substituted concanavalin-A AT 2.0 angstrom resolution. Acta Crystallogr. D, 1993: 49: 561-571.
- ⁹ Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. Anal. Biochem 1976: 72: 248-254.
- ¹⁰ Suvachittanont W, Jaranchavanapet P, Mitogenic effect of *Parkia speciosa* seed lectin on human lymphocytes. Planta Med. 2000: 66: 699-704.
- ¹¹ Kaver I, Pecth M, Trainin N, Greenstein A, Braf Z, T lymphocytes subsets and function in peripheral blood of patients with urological cancer. Oncology, 1992: 49: 108-113.

- ¹² Novogrodsky A, Lotan A, Ravid A, Sharon N, Mitogenic effect of α -mannosidase on lymphocytes. *J. Immunol.*, 1975; 115: 1243-1248.
- ¹³ Barral-Neto M, Santos SB, Barral A, Moreira LIM, Santos CF, Moreira RA, Oliveira JTA, Cavada BS, Human lymphocyte stimulation by lectins from the Diocleae tribe. *Immunol. Invest.*, 1992; 21: 297-303.
- ¹⁴ Borrebaeck CAK, Rougé P, Mitogenic properties of structurally related *Lathyrus* lectins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1986; 248: 30-34.
- ¹⁵ Hsu SM, Ree HJ, Histochemical studies on lectin binding in reactive lymphoid tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, 1983; 31: 538-546.
- ¹⁶ Readler A, Readler EJ, The use of lectins to study normal differentiation and malignant transformation. *J. Cancer Res. Clin.*, 1985; 109: 245-251.
- ¹⁷ Beltrão EIC, Correia MTS, Figueredo-Silva J, Coelho LCBB, Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. *Appl. Biochem. Biotech.*, 1998; 74: 125-134.
- ¹⁸ Wang H, Ng TB, Liu Q, Isolation of a new heterodimeric lectin mitogenic activity from fruiting bodies of the mushroom *Agrocybe cylindracea*. *Life Sci.*, 2002; 70: 877-885.
- ¹⁹ Mizuno M, Shiomi K, Kawakami S, Ashida H, Tsuchida H, Fucogalactan isolated from *Sarcodon aspratus* elicits release of tumor necrosis factor- α and nitric oxide from murine macrophages. *Immunopharmacology*, 2000; 46: 113-121.

Figure 1.

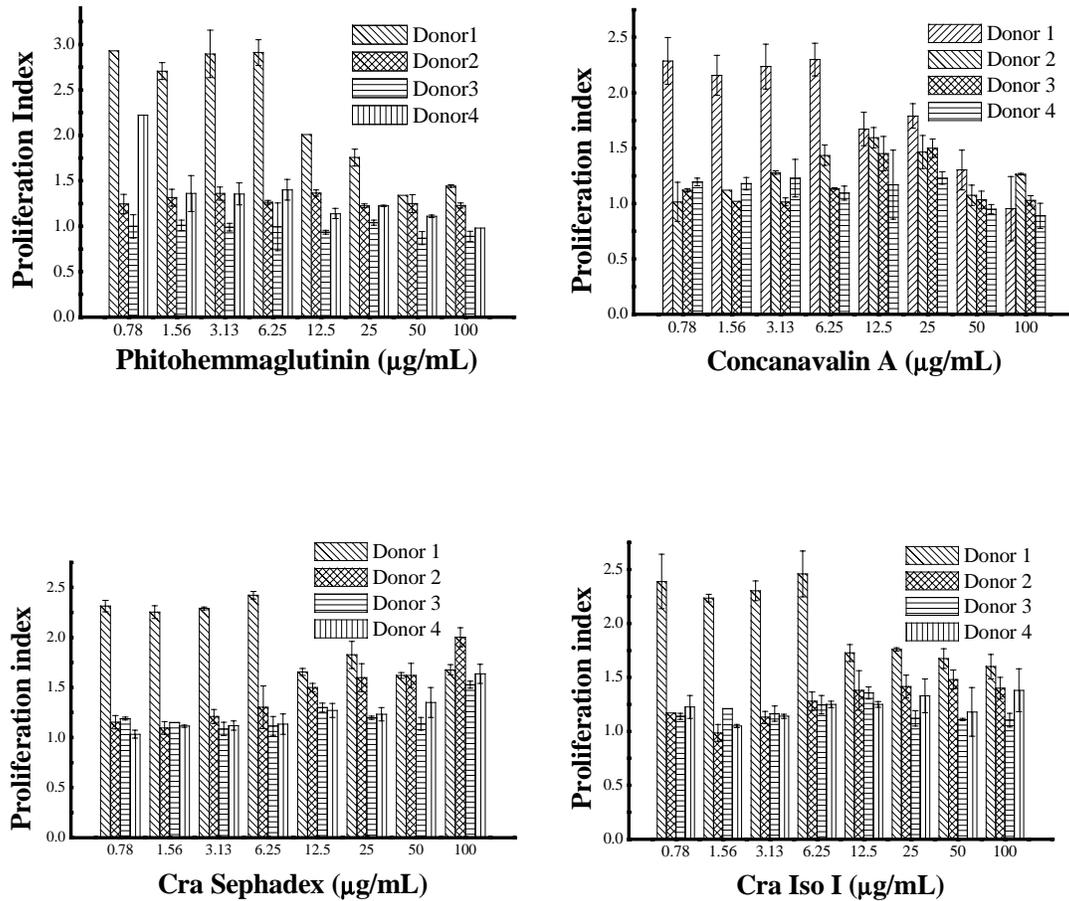


Figure 1: Effect of different concentrations of lectins from four donors on human lymphocytes at 48 h. Data were presented as mean \pm S.D. from triplicates.

Figure 2.

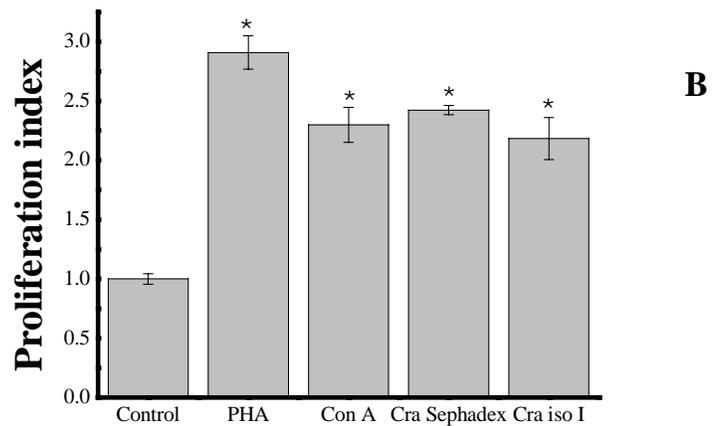
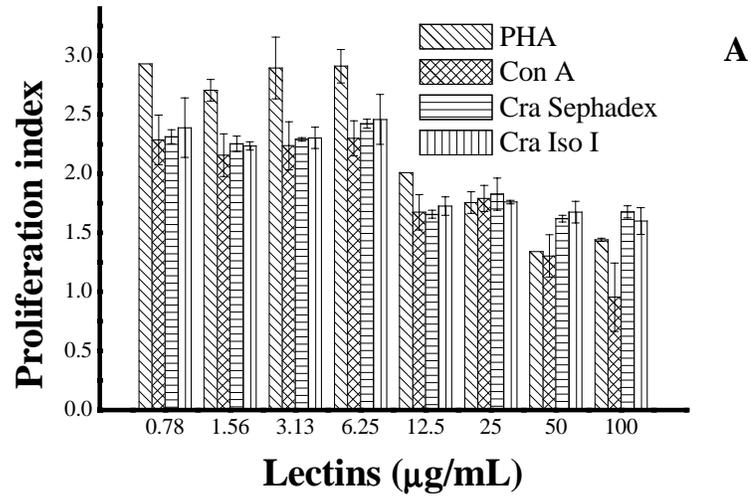


Figure 2: Comparative effect of lectin concentrations (A) and mitogenic effect (B) of different lectins (6.25 µg/ml) on human lymphocytes at 48 h. Data were presented as mean ±S.D. from triplicates. *Significant difference from the control group (p<0.05, Student's *t*-test).

Figure 3.

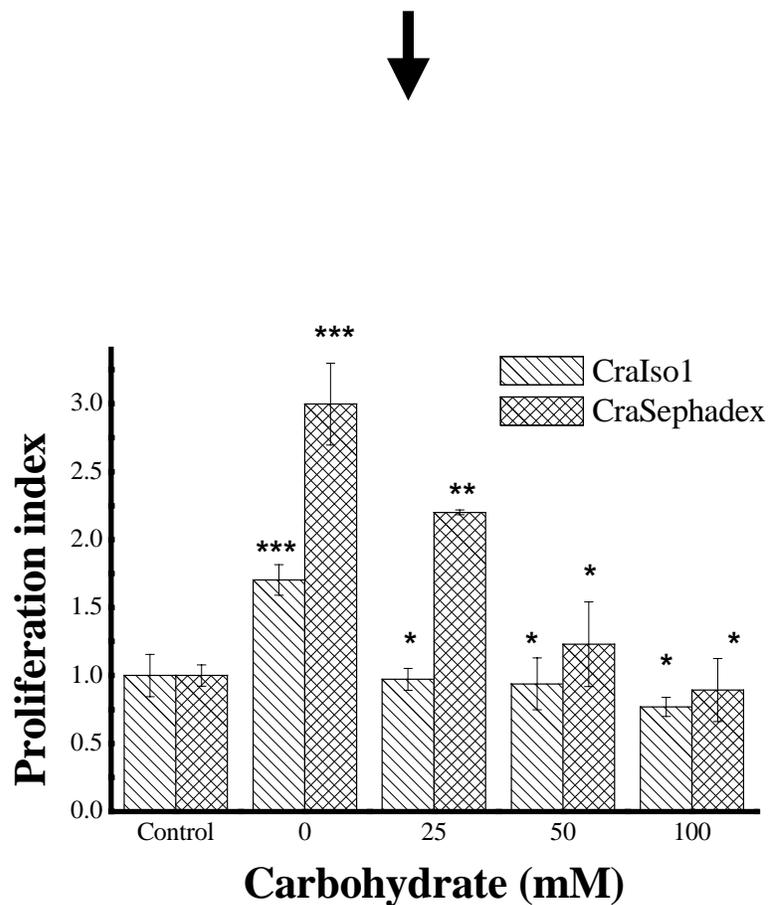


Figure 3: Inhibition of Cra-Sephadex and Cra-Iso 1 mitogenic activity (12.5 $\mu\text{g/ml}$) by methyl- α -D-mannoside at 48 h. Control (proliferation of lymphocyte without lectin or carbohydrate); 0 (proliferation with lectin without carbohydrate). Data were presented as mean \pm S.D. from triplicates. *Significant difference from the 0 group, **significant difference from the control and 0 group and, *** significant difference from the control group ($p < 0.05$, Student's *t*-test).

6 CONCLUSÕES

1. As preparações da lectina de *C. mollis* proliferaram linfócitos humanos de doadores normais;
2. As lectinas foram mitogênicas em todas as concentrações, contudo a concentração que apresentou maior atividade mitogênica variou para cada indivíduo;
3. O carboidrato ligante metil α -D-manosódeo inibiu diferentemente a proliferação de linfócitos pelas preparações lectínicas de *C. mollis*, indicando que o efeito mitogênico está relacionado com o sítio de ligação a carboidrato;
4. Cra-Sephadex ou Cra-Iso 1 podem ser utilizadas como reagentes para o estudo de ativação e proliferação de linfócitos;
5. O método colorimétrico utilizado neste estudo demonstrou ser bastante prático e eficiente para a determinação da proliferação de linfócitos.

ANEXOS