

EFEITO INFLAMATÓRIO LOCAL INDUZIDO PELAS LECTINAS PHA, WGA E JACALINA

Ana Maria Sell*
Celso Paulino Costa**

SELL, A. M.; COSTA, C. P. Efeito inflamatório local induzido pelas lectinas PHA, WGA e jacalina. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, 6 (1): 47-51, 2002.

RESUMO: Muitas das atividades inflamatórias atribuídas às lectinas são decorrentes da atividade quimiotática, da secreção de citocinas pelos leucócitos ativados e da estimulação policlonal de linfócitos. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito inflamatório local induzido pelas lectinas PHA, WGA e jacalina. Para tanto, injeções intradérmicas das lectinas nas concentrações de 25 µg/mL, para PHA e jacalina, e 100 µg/mL, para WGA, foram realizadas no dorso de ratos e avaliações macroscópicas e histológicas foram realizadas. Nas avaliações macroscópicas, os diâmetros das pápulas formadas nos locais das injeções foram medidos diariamente. As análises histológicas foram realizadas em cortes corados com hematoxilina-eosina, nos períodos de 24, 48, 72 horas e no 5º e 7º dias. O padrão macroscópico de reação foi semelhante para PHA e jacalina e menor para WGA. A análise histológica evidenciou reação inflamatória bem localizada e forte nas primeiras 24 horas, com predomínio de células mononucleares na inflamação provocada por PHA e jacalina. Após este período foi evidente a diminuição da inflamação provocada por WGA, porém, para PHA e jacalina a reação inflamatória nas próximas 48 horas foi maior e, a partir daí, diminuiu com o tempo, embora, em todos os períodos analisados, foi ligeiramente maior para PHA.

PALAVRAS CHAVE: Lectinas; PHA; WGA; Jacalina; Inflamação.

LOCAL INFLAMMATORY EFFECTS OF PHA, WGA AND JACALIN LECTINS

SELL, A. M.; COSTA, C. P. Local inflammatory effects of PHA, WGA and jacalin lectins. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, 6 (1): 47-51, 2002.

ABSTRACT: Lectins inflammatory activities are attributed to chemotactic mechanisms, cytokines secretion by activated leukocytes and polyclonal lymphocyte stimulation. The purpose of this work was to evaluate the local inflammatory effects of PHA, WGA and jacalin. Twenty-five µg/mL of PHA and jacalin and 100 µg/mL of WGA were intradermally injected in the dorsal skin of rats. The macroscopic evaluations were based on the daily measurement of the swelling diameters. At the periods of 24, 48, 72 hours, and at the 5th and 7th days, one group of rats was killed and samples were collected for histological examination with hematoxylin-eosin stain. Macroscopic pattern reaction was similar for PHA and jacalin and smaller for WGA. Histological analysis showed strong and located inflammatory reaction at 24 hours for all lectins, and mononuclear cells prevalence in the inflammation provoked by PHA and jacalin. Decreasing of the inflammation provoked by WGA was evident after this period. For PHA and jacalin the inflammatory reaction was largest at 48 hours and decreased at the others periods, although it was slightly larger for PHA.

KEY WORDS: Lectins; PHA; WGA; Jacalin; inflammation.

Introdução

As lectinas representam uma classe de (glico)proteínas de origem não imune, amplamente distribuídas na natureza que se ligam, específica e reversivelmente, a açúcares (LIS & SHARON, 1986; MODY *et al.*, 1995).

As lectinas foram classificadas como mitogênicas ou não mitogênicas conforme a capacidade de aumentarem a síntese de DNA e de induzirem a transformação blástica de populações específicas de linfócitos (WHISLER & YATES, 1980). Dentre as diversas atividades biológicas atribuídas, as lectinas destacam-se: a estimulação mitogênica de células e o envolvimento nos processos de reconhecimento e das

interações celulares, essenciais na proliferação, diferenciação, inibição por contato e morte celular, assim como na formação de órgãos, migração celular, defesa imunológica, metástases, iniciação de infecções e simbiose (SHARON & LIS, 1989; HOLMSKOV *et al.*, 1994; BEUTH *et al.*, 1995).

Muitas das atividades inflamatórias atribuídas às lectinas são decorrentes dos mecanismos de quimioatração, da produção e secreção de citocinas pelos leucócitos ativados e da estimulação policlonal de linfócitos.

Baseando-se nas diversas atividades biológicas das lectinas, este trabalho teve como objetivo avaliar o possível

* Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, UEM.

** Departamento de Diagnóstico Oral, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, FOP, UNICAMP, Piracicaba, São Paulo.

Endereço: Ana Maria Sell. Av. Colombo, 5790. 87020-900, amsell@uem.br.

efeito inflamatório local induzido pelas lectinas de *Phaseolus vulgaris*, PHA, de germe de trigo, WGA, e das sementes de jaca, *Artocarpus integrifolia*, jacalina.

Material e método

Amostra

Ratos albinos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, com idade aproximada de 60 dias e pesando em média 200 gramas, foram utilizados para este estudo. Os animais foram procedentes do Biotério Central da Unicamp e foram mantidos em gaiolas apropriadas, em ambiente com temperatura e umidade controladas. A alimentação constou de ração balanceada padrão e água *ad libitum*.

As lectinas utilizadas neste experimento foram a fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris*, PHA, a lectina de germe de trigo, *Triticum vulgaris*, WGA, e a lectina das sementes de jaca, *Artocarpus integrifolia*, com especificidade aos resíduos de D-galactose, jacalina. PHA foi purificada a partir da variedade Goiano precoce em coluna de ovomucóide, conforme padronizado por GONÇALVES & COSTA (1995). A jacalina foi purificada a partir das sementes de jaca em coluna de afinidade agarose- D- galactose (ROQUE-BARREIRA, 1986). A purificação foi avaliada em gel de eletroforese e pela atividade hemaglutinante. WGA foi obtida da Sigma Chemical Company, catálogo Número L-1005. As concentrações das proteínas foram determinadas por espectrofotometria (absorbância em 280 nm). As lectinas foram diluídas em solução salina e utilizadas nas concentrações adequadas após esterilização em filtro Amicon de 0,22 m μ (Millipore).

Determinação da dose adequada das lectinas

As doses das lectinas a serem utilizadas nas reações inflamatórias foram determinadas experimentalmente. As doses consideradas como ideal foram aquelas que não induziram necrose no local de aplicação e que formaram pápulas de mesmo diâmetro após 24 horas.

Para este experimento, foram utilizados quatro grupos com três animais cada. Em cada animal foram realizadas três injeções de 100 μ L com a solução estéril das lectinas, nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 μ g/mL. Como controle foi utilizada solução salina fisiológica, em igual volume. Os animais foram anestesiados com éter etílico e depilados manualmente, apenas no local da injeção. As medidas dos diâmetros das pápulas foram realizadas entre o primeiro e o sétimo dia após a injeção. Para a medida, as pápulas foram primeiramente delimitadas com caneta esferográfica: ao riscar a pele com a caneta, esta escorrega na pele normal, mas fica presa na região edemaciada ou endurecida pela reação celular. Como este procedimento foi realizado em diferentes posições, a área delimitada adquiriu um formato circular e o diâmetro obtido foi medido. O experimento foi realizado com duas repetições.

Avaliação da reação inflamatória

Para cada lectina foram estabelecidos, de forma aleatória, cinco grupos experimentais, contendo três animais cada. Em cada animal foram realizadas três injeções intradérmicas, no dorso, na região interescapular, sendo duas teste e uma controle. As posições das injeções controle e teste foram aleatórias. Diariamente os diâmetros das pápulas foram medidos. No período compreendido por 24, 48, 72 horas, no quinto e no sétimo dias após a injeção, os animais foram anestesiados, sacrificados e a região da pele inflamada foi removida, com margem de segurança, sendo conservada em formol a 4%. As peças foram cortadas ao meio e preparadas de forma a conter uma região de tecido inflamado circundada por tecido normal. Após lavagem em água corrente, desidratação, diafanização e inclusão em parafina, cortes de 7,0 μ m foram realizados e as lâminas foram coradas com hematoxilina - eosina para a avaliação das características celulares. Cada experimento foi realizado em três repetições.

As análises microscópicas foram realizadas em todas as lâminas sendo fotografado o centro da região inflamada. As análises histológicas e as fotografias foram realizadas em fotomicroscópio Zeiss - Pol 01.

Resultados

Para avaliar o possível efeito inflamatório local provocado pelas lectinas PHA, WGA e jacalina na pele de ratos, a dose a ser utilizada foi determinada experimentalmente. A concentração adequada foi determinada de acordo com duas características: a não formação de necrose no local de injeção e que o tamanho da pápula formada após vinte e quatro horas fosse o mesmo para todas as lectinas. As concentrações encontradas foram iguais a 25 μ g/mL para as lectinas PHA e jacalina e a 100 μ g/mL para WGA.

Diariamente e por um período de sete dias, o tamanho das pápulas formadas nos locais de injeção foi medido. A Figura 1 representa o resultado da análise macroscópica do processo inflamatório. Embora a reação inicial fosse de mesmo diâmetro, as reações inflamatórias induzidas pelas lectinas PHA e jacalina foram semelhantes e a reação provocada por WGA foi menor na concentração de 100 μ g/mL. No grupo controle ocorreu, nas primeiras 24 horas, a formação de pápula, conseqüente da injeção do veículo; esta pápula diminuiu no segundo e terceiro dias e desapareceu no quarto dia. Tanto na resposta inflamatória induzida por PHA como por jacalina, foi observada uma diminuição no tamanho das pápulas nos três primeiros dias. Quando PHA foi administrada, o diâmetro da pápula aumentou no quarto e quinto dias e decresceu no sexto e sétimo dias. No grupo injetado com a jacalina, a alteração do diâmetro da pápula foi menos acentuada. O tamanho da pápula formada após a injeção de WGA foi menor, embora esta lectina tenha sido usada numa concentração quatro vezes superior. O diâmetro da reação diminuiu lentamente

durante todo o período analisado e, em alguns locais de aplicação, houve a formação de necrose.

Quando a lectina PHA foi aplicada em doses maiores, um aumento da reação macroscópica ocorreu proporcionalmente, no entanto, quando a jacalina foi aplicada nestas mesmas doses, a medida macroscópica da reação inflamatória local revelou pouca diferença (resultados não mostrados).

O resultado macroscópico da aplicação de WGA na concentração de 25 mg/mL foi apresentado na mesma figura, demonstrado a menor reação inflamatória provocada por esta lectina, quando usada na mesma concentração que as demais.

As análises histológicas foram realizadas em cortes corados com hematoxilina-eosina, nos períodos compreendidos por 24 horas, 48 horas, 72 horas, 5 dias e 7 dias após a injeção. As reações histológicas evidenciaram inflamação bem localizada e forte para as lectinas nas primeiras 24 horas: houve predomínio de células mononucleares, principalmente linfócitos, na inflamação induzida por PHA e jacalina (Figura 3); para WGA, a proporção entre células mononucleares e polimorfonucleares foi semelhante (Figura 4). Após este período foi evidente a diminuição da inflamação provocada por WGA: após 48 horas, a reação inflamatória é muito fraca e predominam as células mononucleares e a partir de 72 horas, a reação é mais fraca, podendo ser considerada normal (Figura 9). Para as lectinas PHA e jacalina, a reação inflamatória nas próximas 48 horas é maior que no período anterior (Figura 5). Em 72 horas, a reação inflamatória é menor e bem localizada na hipoderme (Figura 7). A partir daí, no quinto e sétimo dias, a quantidade de células inflamatórias diminuiu, proporcionalmente, embora fosse, em todos os períodos analisados, ligeiramente maior para PHA (Figuras 8 e 10).

No grupo controle, não foram observadas reações inflamatórias, o tecido apresentou organização normal estando presentes fibroblastos e fibras colágenas organizadas. Após 24 horas ocorreu, em algumas regiões, a separação das fibras de colágeno, possivelmente decorrentes da injeção de solução salina (Figura 2).

Discussão

As lectinas PHA e jacalina foram utilizadas nas concentrações de 25 µg/mL ou $0,2 \times 10^{-6}$ M e $0,6 \times 10^{-6}$ M, respectivamente. WGA foi utilizada numa concentração bem maior, 100 µg/mL ou $2,7 \times 10^{-6}$ M; esta concentração foi a de escolha uma vez que produziu uma reação inicial semelhante à das outras lectinas.

O padrão macroscópico de reação foi semelhante para as lectinas PHA e jacalina, porém, quando PHA foi aplicada em doses maiores, um aumento da reação macroscópica ocorreu, proporcionalmente. O aspecto macroscópico de evolução da inflamação não acompanhou o histológico. Nas primeiras 72 horas foram inversamente proporcionais. A formação da pápula nas primeiras vinte e quatro horas e a posterior diminuição de seu tamanho, possivelmente está relacionada com o processo de agressão decorrente da injeção,

uma vez que, neste mesmo período, também foi observada a formação de pápula nos animais controles. Para a lectina de germe de trigo, WGA, o tamanho da pápula foi grande nas primeiras 24 horas decrescendo a partir das próximas 48 horas até o sétimo dia, indicando uma reação inflamatória celular bem menor. A análise histológica, confirmou a fraca indução de inflamação provocada por esta lectina.

O efeito inflamatório local provocado pelas lectinas está relacionado às suas atividades biológicas como a estimulação mitogênica, quimiotaxia e a indução da secreção de citocinas pelas células ativadas.

Atividade quimiotática para leucócitos foram descritas para PHA (MODY *et al.*, 1995) e para a jacalina (SAKAMOTO *et al.*, 1995; FELIPE *et al.*, 1995). Outras lectinas também apresentam atividade quimiotática. SANTOS-DE-OLIVEIRA *et al.* (1994) observaram que a artocarpina, uma outra lectina presente nas sementes de jaca, com especificidade aos resíduos de D-manose, induz a migração de neutrófilos na cavidade peritoneal e *air-pouch*, em ratos. Con-A aumenta o número de células mononucleares, após injeção intraperitoneal (FELIPE *et al.*, 1995) e as lectinas de soja exercem quimioatração sobre neutrófilos e ativam macrófagos (BENJAMIN *et al.*, 1997).

A atividade inflamatória também pode ser devido a estimulação inespecífica de leucócitos. PHA e jacalina induziram reação inflamatória predominantemente mononuclear, enquanto o efeito inflamatório de WGA foi fraco com grande proporção de polimorfonucleares. De fato, PHA é um mitógeno clássico (NOWELL, 1960) e a jacalina é estimuladora da subpopulação de linfócitos T CD4 (PINEAU *et al.*, 1990). Ao contrário, a lectina de germe de trigo somente ativa os linfócitos B em condições especiais, além de exercer efeito inibidor sobre o metabolismo dos linfócitos (GREENE & WALDMANN, 1981).

A estimulação da produção de citocinas pelos leucócitos em cultura, quando ativadas com estas lectinas também foram documentadas. Células sanguíneas humanas cultivadas na presença de PHA secretam interferon-gama, $INF\gamma$, e fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos, GM-CSF (VAN WAUNE *et al.*, 1995). Jacalina estimula a produção de $INF\gamma$, em hibridomas de linfócitos T (CRANE *et al.*, 1984) além de fatores de crescimento de linfócitos T pelas células esplênicas de ratos (DALMAU *et al.*, 1993). $INF\gamma$ é uma citocina ativadora de macrófagos. Os macrófagos ativados adquirem diversas habilidades biológicas tornando-se aptos a participarem de diversos mecanismos intermediários, importantes na reação inflamatória. Além disso, a expressão de moléculas de adesão na superfície dos leucócitos e endotélio pode ser aumentada por mitógenos e linfocinas, como $INF\gamma$ e fator de necrose tumoral, TNF. A adesão das células ao endotélio representa a primeira etapa no processo de emigração celular dos leucócitos para os tecidos (DiCORLETO & DE LA MOTTE, 1989).

O efeito inflamatório local induzido por outras lectinas foi abordado (BENJAMIN *et al.*, 1997; SANTOS-DE-

OLIVEIRA *et al.* 1994).

Conclusão

As lectinas induziram reação inflamatória bem localizadas, no ponto de aplicação, porém com intensidade e cinética celular diferentes. As lectinas mitogênicas, PHA e jacalina, induziram reação inflamatória forte, com predominância de células mononucleares. A reação foi semelhante para ambas, embora ligeiramente maior para PHA nos períodos analisados. WGA, uma lectina anti-mitogênica, induziu fraca reação inflamatória.

Agradecimentos: UEM/UNICAMP/PACD-CAPES.

Referências

- BENJAMIN, C.F. *et al.* Inflammatory and anti-inflammatory effects of soybean agglutinin. *Braz. J. med. Biol. Res.*, 30 (7): 873-881, 1997.
- BEUTH, J. *et al.* Importance of lectins for the prevention of bacterial infections and cancer metastases. *Glycoconj. J.*, 12: 1-6, 1995.
- CRANE, I. *et al.* The preparation of interferon gamma- producing T-cell hibridomas from jacalin stimulated T lymphocytes and the SH9 T-cell line. *Immunol.*, 53: 855-859, 1984.
- DALMAU, S.R.; MACIEL, C.M. & FREITAS, C.S. Jacalin: an excellent lectin for obtaining T cell growth activity from rat spleen cells. *Braz. J. med. Biol. Res.*, 22: 1111-1120, 1989.
- DiCORLETO, P.E. & DE LA MOTTE. Role of cell surface carbohydrate moieties in monocytic cell adhesion to endothelium in vitro. *J. Immunol.*, 143 (11): 3666-3672, 1989
- FELIPE, I.; BIM, S. & SOMENSI, C C. Increased clearance of *Candida albicans* from the peritoneal cavity of mice pretreated with concanavalin A or jacalin. *Braz. J. med. Biol. Res.*, 28: 477-483, 1995.
- GONÇALVES, R.B. & COSTA, C.P. Isolation of the lectin and L₄ isolectin from *Phaseolus vulgaris* by affinity chromatography on insoluble ovomucoid. *Braz. J. med. Biol. Res.*, 28: 191-194, 1995.
- GREENE, W.C. & WALDMANN, T.A. Stimulation of immunoglobulin biosynthesis in human B cells by wheat germ agglutinin. I. Evidence that WGA can produce both a positive and negative signal for activation of human lymphocytes. *J. Immunol.*, 127(2): 799-804, 1981.
- HOLMSKOV, U. *et al.* Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. *Immunol. Today*, 15 (2): 67-73, 1994
- LIS, H. & SHARON, N. Lectin as molecules and tools. *Ann. Rev. Biochem.*, 55: 35-67, 1986.
- MODY, R.; JOSHI, S. & CHANEY, W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 33 (1): 1-10, 1995.
- NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes. *Cancer Res.*, 20: 426-6, 1960.
- PINEAU, N. *et al.* Jacalin: a lectin mitogenic for human CD4 T lymphocytes. *Clin. exp. Immunol.*, 80: 420-425, 1990.
- ROQUE-BARREIRA, M.C.; GREENE, L.J. & CAMPOS-NETO, A. Purification of jacalin on agarose-D-galactose. *Braz. J. med. Biol. Res.*, 19 (4-5): 638A, 1986.
- SANTOS-DE-OLIVEIRA, R. *et al.* A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. *J. Immunol.*, 153: 1798-1807, 1994.
- SAKAMOTO, M.; DIAS-BARUFFI, M.; & ROQUE-BARREIRA, M. C. A. *Seletividade na migração de neutrófilos induzida por jacalina*. In: Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia, 20., 1995, Angra dos Reis, Rio de Janeiro. Anais..., 1995.
- SHARON, N. & LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. *Science*, 246: 227-234, 1989.
- VAN WAUNE, J.; AERTS, F. & BOER, M. Cytokine production by phytohemagglutinin-stimulated human blood cells: Effects of corticosteroids, T cell immunosuppressants and phosphodiesterases IV inhibitors. *Inflamm. Res.*, 44: 400-405, 1995
- WISLER, R.L. & YATES, A.J. Regulation of lymphocyte responses by human gangliosides. I- characteristics of inhibitory effects and the induction of impaired activation. *J. Immunol.*, 125: 2106-2111, 1980.

Recebido em: 25/07/2001

Aceito em: 20/08/2002

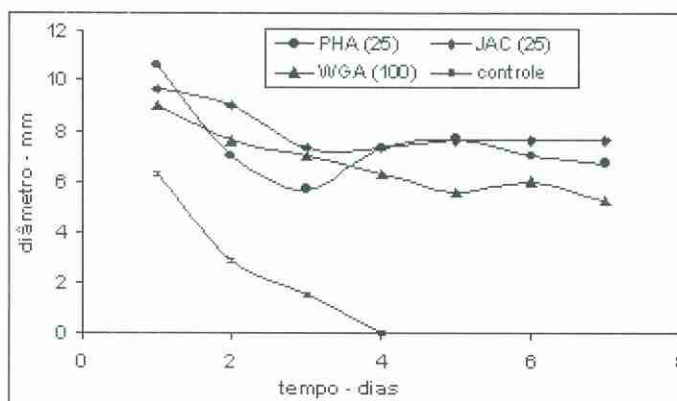


Figura 1 - Análise macroscópica da reação inflamatória local provocada pelas lectinas.

Coloração com hematoxilina-eosina. Aumento de $6,3 \times 1,25 \times 10$ ou de $16 \times 1,25 \times 10^*$.



Figura 2 (Controle/24 horas)

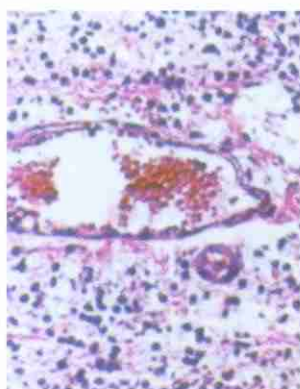


Figura 3 * (PHA/24 horas)

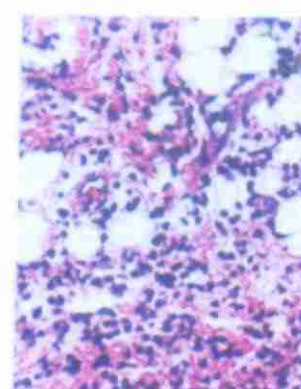


Figura 4 *(WGA/24 horas)

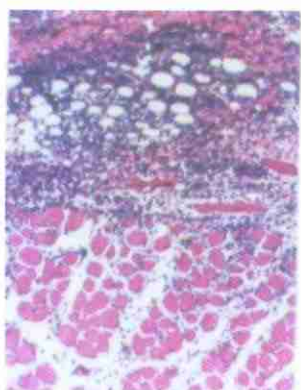


Figura 5 (PHA/48 horas)

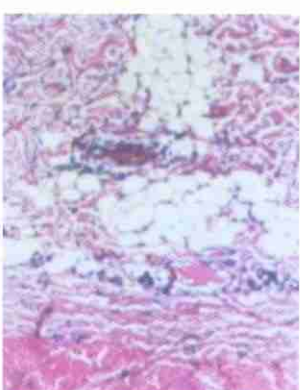


Figura 6 (WGA/48 horas)

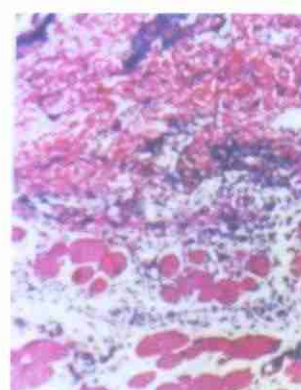


Figura 7 (PHA/72 horas)



Figura 8 (PHA/5 dias)



Figura 9 (WGA/5 dias)



Figura 10 (PHA/7 dias)