

CELSO PAULINO DA COSTA

INTERAÇÃO DE LECTINAS DE SEMENTE DE JACA (Artocarpus Integrifolia)  
COM GLICOPROTEINAS DA SALIVA E SORO HUMANO

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de  
Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas,  
para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências,  
na Área de Biologia e Patologia Buco Dental.

P i r a c i c a b a

1 9 8 9

C823i

11166/BC

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

Este exemplar foi devidamente corrigido,  
conforme resolução CCPG 036/83

Maricaba, 11 de julho de 1983



Jaime A. Cury  
Professor de Bioquímica  
FOP - UNICAMP

ORIENTADOR: PROF. DR. JAIME APARECIDO CURY

## D E D I C A T Ó R I A

A Toninha e nossos filhos Vinicius, Erica e Alexandre, pelo estímulo, compreensão e abdicacão.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. JAIME APARECIDO CURY, pela orientação, amizade e estímulo.

Aos técnicos da Área de Bioquímica MARISA DE JESUS CARLOS SOARES e especialmente ao WALDOMIRO VIEIRA FILHO, pela amizade e ajuda nas inúmeras repetições de testes de laboratório e na confecção de gráficos e cartazes.

Ao Laboratório de Patologia Clínica (PREVLAB), na pessoa do Diretor Técnico CESAR B. SANCHES, pelo apoio, nos fornecendo materiais.

Ao ADARIO CANGIANI pelas fotografias.

Ao IVES ANTONIO CORAZZA pela datilografia computadorizada.

Ao NILSON JOSE MORAL, pela sua participação no trabalho.

A todas as pessoas e instituições que de alguma forma permitiram a execução e término deste trabalho.

Este trabalho NÃO recebeu apoio nem ajuda financeira de qualquer agência financiadora de pesquisa.

Porém, não foi solicitado.

Foi realizado com recursos da Área de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, empréstimo de aparelhos de outras disciplinas e fornecimento de materiais por gentileza de pesquisadores e instituições.

# INDICE

	Página
1 - INTRODUÇÃO . . . . .	11
2 - REVISÃO DA LITERATURA. . . . .	13
2.1 - Mecanismos de defesa contra microrganismos na cavidade bucal. . . . .	13
2.2 - Lectinas . . . . .	17
2.2.1 - Aspectos gerais. . . . .	17
2.2.2 - Interação de lectinas com glicoproteínas seri- ricas. . . . .	21
2.2.3 - Interação de lectinas com glicoproteínas sa- livares . . . . .	22
2.2.4 - Lectina de semente de jaca . . . . .	26
3 - MATERIAL E MÉTODO. . . . .	28
3.1 - Semente de Jaca. . . . .	28
3.2 - Preparação do extrato bruto proteico . . . . .	28
3.3 - Fracionamento do extrato bruto de semente de jaca através de cromatografia de afinidade. . . . .	29
3.4 - Saliva . . . . .	30
3.4.1 - Saliva obtida sem estímulo . . . . .	30
3.4.2 - Saliva concentrada . . . . .	30
3.5 - Soro humano. . . . .	30
3.5.1 - Soro humano normal . . . . .	30
3.5.2 - Soro deficiente de IgA . . . . .	31
3.5.3 - Soro de pacientes portadores de hipergamoglo- nulinemia. . . . .	31
3.6 - Soro anti-IgA humano . . . . .	31

3.7 -	Reação de precipitação em meio líquido . . . . .	32
3.7.1 -	Reação de extrato de semente de jaca (EB) e glicoproteínas salivares . . . . .	32
3.7.2 -	Reação de extrato de semente de jaca (EB) e glicoproteínas do soro . . . . .	32
3.8 -	Reação de precipitação em meio semi-sólido - Dupla difusão em gel de agarose. . . . .	33
3.9 -	Eletroforese em agarose. . . . .	33
3.10-	Imunoeletroforese em agarose . . . . .	33
3.11-	Eletroforese em gel de poliacrilamida. . . . .	34
3.12-	Reações de precipitação entre lectinas de semente de jaca e glicoproteínas da saliva e soro humano, após separação eletroforética em gel de poliacrilamida. . .	34
3.13-	Reação da hemaglutinação . . . . .	35
4 -	RESULTADOS . . . . .	36
4.1 -	Fracionamento do extrato bruto (EB), da semente de jaca através de cromatografia de afinidade . . . . .	36
4.2 -	Reação de precipitação entre lectinas de semente de jaca e saliva humana normal. . . . .	41
4.2.1 -	Precipitação em meio líquido . . . . .	41
4.2.2 -	Precipitação em gel de agarose dupla difusão .	41
4.2.2.1 -	EB e Saliva. . . . .	41
4.2.2.2 -	Eluato galactose e Saliva. . . . .	43
4.2.2.3 -	Eluato PBS e Saliva. . . . .	43
4.2.3 -	Precipitação em gel de poliacrilamida. . . . .	44
4.2.3.1 -	EB e Saliva. . . . .	44
4.2.3.2 -	Eluato PBS e Saliva. . . . .	45
4.2.3.3 -	Eluato galactose e Saliva. . . . .	45
4.3 -	Reação de precipitação entre lectinas de semente de jaca e saliva humana deficiente em IgA . . . . .	46



4.4 -	Reação de precipitação entre lectinas de semente de jaca e glicoproteínas do soro humano normal. . . . .	51
4.4.1 -	Precipitação em meio líquido . . . . .	51
4.4.2 -	Precipitação em gel de agarose . . . . .	51
4.4.2.1 -	EB e soro humano normal. . . . .	51
4.4.2.2 -	Eluato PBS e soro humano normal. . . . .	52
4.4.2.3 -	Eluato galactose e soro humano normal. . . . .	52
4.4.2.4 -	Lectinas de semente de jaca e soro humano deficiente em IgA . . . . .	54
4.4.3 -	Reações de precipitação entre lectinas de semente de jaca e glicoproteínas do soro humano, após separação eletroforética em gel de poliacrilamida . . . . .	54
4.4.3.1 -	EB e Soro humano normal . . . . .	54
4.4.3.2 -	Eluato PBS e Soro humano normal . . . . .	57
4.4.3.3 -	Eluato galactose e Soro humano normal . . . . .	58
4.4.3.4 -	EB e Soro deficiente em IgA . . . . .	58
4.4.3.5 -	Eluato PBS e Soro deficiente em IgA. . . . .	59
4.4.3.6 -	Eluato galactose e Soro deficiente em IgA . . . . .	61
4.4.3.7 -	EB e Soro de mieloma de IgA (RC) . . . . .	61
4.4.3.8 -	Eluato PBS e Soro de mieloma de IgA (RC) . . . . .	63
4.4.3.9 -	Eluato galactose e Soro de mieloma de IgA (RC) . . . . .	63
4.4.3.10 -	EB e Soro de mieloma de IgA (GO) . . . . .	63
4.4.3.11 -	EB e Soro de mieloma de IgA (DD) . . . . .	64
4.4.4 -	Reação de precipitação entre EB e glicoproteínas de urina de paciente (RC), portador de mieloma de IgA após separação eletroforética em gel de poliacrilamida . . . . .	67

4.5 - Reação de hemaglutinação entre lectinas de semente de jaca e hemácias humanas . . . . .	67
4.5.1 - Especificidade de grupo sanguíneo ABO . . . . .	67
4.5.2 - Inibição da hemaglutinação com açúcares . . . . .	69
4.5.2.1 - EB e eluato galactose . . . . .	69
4.5.2.2 - Eluato PBS. . . . .	69
5 - DISCUSSÃO. . . . .	73
6 - RESUMO . . . . .	80
7 - SUMMARY. . . . .	82
8 - CONCLUSÕES . . . . .	84
9 - BIBLIOGRAFIA . . . . .	85

# INTERAÇÃO DE LECTINAS DE SEMENTE DE JACA (*Artocarpus integrifolia*) E GLICOPROTEINAS DA SALIVA E SORO HUMANO

## 1 - INTRODUÇÃO

Desde o século passado é conhecido o fato de que extratos de plantas, apresentam a propriedade de aglutinar hemácias (STILLMARK, 1888). Estas substâncias foram inicialmente denominadas de *Fito-hemoaglutininas*. Logo a seguir, as substâncias que apresentavam esta propriedade foram caracterizadas como sendo uma proteína e posteriormente foram chamadas de *lectinas* (BOYD & SHAPLEIG, 1954).

Atualmente se conhecem lectinas também de origem animal e várias outras propriedades biológicas foram descobertas além da hemaglutinação, como aglutinação de leucócitos, bactérias, protozoários, atividade mitogênica para linfócitos e reação de precipitação de glicoproteínas (SHARON & LIS, 1987).

A atividade da lectina se deve ao fato de reagir especificamente com açúcares e como apresenta dois ou mais sítios de ligação, ao reagir com glicoproteínas que apresentam os açúcares para os quais são específicos, ocorre a formação de complexos macromoleculares *Lectina-Glicoproteínas*, que são precipitados (GOLDSTEIN & HAYES, 1978).

A lectina de semente de jaca (*A.integrifolia*) tem a propriedade de reagir especificamente com resíduos de galactose.

Foi demonstrado por ROQUE BARREIRA & CAMPOS-NETO (1984), que esta lectina reage e precipita IgA do soro e secreções como colostro

humano, uma vez que esta glicoproteína possui resíduos de galactose em sua molécula

A IgA da saliva apresenta papel importante na defesa contra microrganismos na cavidade bucal, como tem sido demonstrado pela maior incidência de doenças em indivíduos com ausência ou baixa quantidade desta glicoproteína (LEGLER et al, 1981). A quantificação da IgA na saliva apresenta grande interesse no estudo das doenças bucais. Atualmente, a dosagem de IgA é feita através de técnica de difusão em gel, o que demanda uma série de procedimentos como: purificação, imunização de animais para obtenção de soro específico e padronização da técnica.

Se lectina da semente de jaca interagir seletivamente com o IgA da saliva, este material seria de grande utilidade no estudo da quantificação da IgA salivar em diferentes patologias bucais, assim como no acompanhamento da taxa de anticorpos salivares após imunização, por exemplo, quando da avaliação de vacinas anti-cárie.

No presente trabalho procuramos determinar se jacalina, a lectina da semente de jaca, reage com a IgA da saliva, e se é seletiva para esta glicoproteína, comparada às interações com IgA e glicoproteínas do soro já conhecida.

## 2 - REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 - Mecanismos de defesa contra microrganismos na cavidade bucal

Na relação do homem com microrganismos, como as bactérias, alguns aspectos são interessantes. A presença de bactérias na maioria dos tecidos provoca infecção, que resulta na eliminação das bactérias ou na morte do hospedeiro. Entretanto, a presença de microrganismos na superfície da pele e da mucosa é bem tolerada e até mesmo benéfica numa relação de simbiose. O tipo e o número de bactérias variam conforme o local, adaptando-se microrganismos que vão constituir a microbiota humana habitual.

Na cavidade bucal as bactérias se concentram em diferentes regiões formando os chamados "nichos ecológicos bucais" (MORHART, & FITZGERALD, 1984), como dorso da língua, superfície de dentes, mucosa bucal, sulco gengival e a saliva, que é uma mistura de bactérias componentes dos vários nichos.

O desequilíbrio na qualidade e quantidade destes microrganismos, alterando a microbiota habitual, é que pode contribuir para o surgimento de doenças. A microbiota bacteriana na cavidade bucal é influenciada por diversos fatores, tais como a presença de dentes, próteses, hábitos dietéticos e de higiene e fatores relacionados a propriedades físico-químicas da saliva, como fluxo, capacidade tampão e proteínas com atividades antimicrobianas.

Dentre as proteínas da saliva que apresentam atividades

antimicrobianas figuram as enzimas.

A *lisozima* ou *muramidase* com PM de 14000, tem a propriedade de hidrolisar as ligações  $\beta$  1-4 entre ácido N-acetil glucosamina, constituintes da parede celular de bactérias (NEWBRUN, 1983). Maior concentração de *lisozima* é encontrada na saliva secretada pelas glândulas sublinguais e submandibulares (HOERMAN, et al, 1956). A *lisozima* não lisa e nem previne o crescimento de culturas de bactérias predominantes na cavidade bucal do homem (GIBBONS, et al., 1966). A atividade da *lisozima*, na saliva total, é significativamente maior em crianças livre de cáries, quando comparada a grupos susceptíveis (TVETMAN, et al, 1981).

A eficiência da *lisozima* em destruir especificamente microrganismos cariogênicos, não tem sido demonstrado, mas provavelmente influencia o equilíbrio ecológico da microbiota bucal.

A *Lactoperoxidase* é uma glicoproteína com atividade enzimática, que inibe o metabolismo bacteriano através da oxidação do tiocianato na presença de peróxido de hidrogênio, formando ions hipotiocianito, que reage com grupos sulfidrilas de enzimas bacterianas, promovendo sua inativação (NEWBRUN, 1983).

A *Lactoperoxidase* tem peso molecular em torno de 78.000 contém 8 ligações dissulfídicas, um grupo heme, 0,017% de ferro e seu conteúdo de carboidrato é em torno de 10% (ERICSON, & MAKINEN, 1986).

A *Lactoperoxidase* é ativa contra microrganismos que acumulam peróxido, tais como Lactobacillus acidophylus e streptococcus cremoris, provavelmente por impedir o acúmulo de lisina e ácido glutâmico, aminoácidos essenciais ao crescimento bacteriano (CLEM, &

KLEBANOFF, 1966). Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de *lactoperoxidase* nas secreções das glândulas parótidas e submandibulares de indivíduos susceptíveis e resistentes à cárie dental (ZENGO, 1971).

Além da *lactoperoxidase* a ação antimicrobiana de glicoproteínas da saliva é exercida por outros mecanismos. A *lactoferritina* é uma glicoproteína com peso molecular em torno de 77.000, contendo 10% de seu peso em carboidrato, apresenta atividade bacteriostática (ORAM, & REITER, 1968) e bactericida (ARNOLD, et al, 1981), contra vários microrganismos Gram positivos e Gram negativos (BORTNER, et al, 1986). Sua atividade antimicrobiana está relacionada a sua capacidade de quelação de íons ferro, diminuindo a disponibilidade deste elemento para a nutrição bacteriana.

*Aglutininas não imunes*, são glicoproteínas de alto peso molecular constituídas por 15 subunidades cada uma com peso molecular em torno de 450.000. Seu conteúdo de carboidrato é em torno de 45%, sendo frequente a presença de fucose. Estas glicoproteínas apresentam a capacidade de reagir e aglutinar bactérias da cavidade bucal na presença de íons cálcio. Sua concentração na saliva da parótida é baixa, em torno de 0,001%, mas sua atividade aglutinante é extremamente alta. Concentração de 0,1 micrograma pode aglutinar  $10^8$  a  $10^9$  bactérias (ERICSON, & RUNDEGREN, 1983).

A *IgA secretora* é outra glicoproteína que tem sido estudada quanto a sua propriedade de interagir com microrganismos da cavidade bucal. Para elucidar o efeito protetor do sistema imune, na formação de cáries dentárias, tem sido correlacionado maior incidência de cárie

dental em indivíduos portadores de imunodeficiência (LEGLER, et al, 1981). Em ratos tem sido testado o efeito de vacinas para aumentar a quantidade de IgA salivar específica para S.mutans e, consequentemente, redução de cárie dental (McGHEE, et al, 1975 e TANZER, et al, 1973).

A imunoglobulina predominante na saliva é a IgA, sendo produzida por plasmócitos situados nas glândulas salivares maiores e menores. A estrutura molecular da IgA da saliva e de outras secreções é diferente da IgA sérica. Nesta última, a forma predominante é monomérica, enquanto que na saliva o predomínio é de complexos moleculares constituídos por moléculas de IgA (PM 160.000), ligadas pela cadeia peptídica J (PM 15.000 ), e o componente glicoproteico, peça secretora (PM 80.000 ) ligadas entre si através de ligações dissulfídicas, formando dímeros (HALPERN, & KOSHLAND, 1970; MESTECKY, 1971). Este complexo, conhecido como IgA secretora, é produzido por dois tipos de células. Enquanto que a IgA e a cadeia J são secretadas pelos plasmócitos, o componente secretor é unida a IgA dimérica, durante seu transporte seletivo através das células do epitélio secretor, para o lumen glandular (KILIAN & BRATTHALL, 1986). A componente secretor confere uma importante propriedade à IgA secretora, que é a maior resistência à hidrólise por enzimas proteolíticos produzidos por microrganismos e das secreções mucosas (TAUBMAN, M. A., et al, 1978).

Duas sub-classes de IgA; IgA<sub>1</sub> e IgA<sub>2</sub> tem sido identificadas no soro e secreções humanas. A IgA<sub>1</sub> corresponde a cerca de 80 a 90% da IgA sérica enquanto que nas secreções externas a IgA<sub>1</sub> constitui somente 50 a 74% do total de IgA secretora (DELACROIX, et al, 1982). A



função biológica das sub-classes de IgA é pouco conhecida. Entretanto, tem sido mostrado que a IgA<sub>1</sub> é suscetível a enzimas como a IgA<sub>1</sub> pro-tease, secretada por bactérias que estão presentes na fase inicial da formação da placa dental como o Streptococcus mitior, Streptococcus sanguis entre outras bactérias (KILIAN, et al, 1983). O componente secretor não protege a IgA<sub>1</sub> que é quebrada ao nível da cadeia pesada, perdendo sua atividade de anticorpo pela ação da protease IgA<sub>1</sub>.

A IgA como as demais imunoglobulinas humanas, apresentam na sua molécula uma quantidade de carboidrato característica de cada classe de imunoglobulina (CLAMP, & PUTNAN, 1967).

O componente de carboidrato de IgA é em torno de 8% de seu peso. Os açúcares estão presentes na cadeia pesada (BAENZIGER, & KORNFIELD, 1974a). A IgA<sub>1</sub> tem oligossacarídeos adicionais ligados O-glicosidicamente à cadeia peptídica. Resíduos N-acetil-galactosamina e galactose, ligam-se à serina na região da dobradiça da IgA<sub>1</sub>, diferenciando-a da IgA<sub>2</sub> e de outras imunoglobulinas (BAENZIGER, & KORNFIELD, 1974b)

## 2.2 - Lectinas

### 2.2.1 - Aspectos Gerais

Há cerca de um século, enquanto estudava a toxicidade de extratos tóxicos de Ricinus communis, STILMARK, (1888) fez a primeira observação de que este extrato aglutinava hemácias de diversas espécies, e que a substância que apresentava esta propriedade era uma proteína tipo globulina e a denominou "ricina".

Estes trabalhos iniciais, atraíram a atenção de Paul Ehrlich, do Royal Institute Of Experimental Therapy, Frankfurt. Ele utilizou as aglutininas de plantas como modelo de antígeno. Estas substâncias eram fáceis de serem preparadas em grandes quantidades, eram estáveis e mais importante, quando injetadas em animais, causavam a produção de anticorpos que inibiam, tanto a atividade tóxica como a aglutinante, facilitando seu estudo "in vitro".

Apesar da preparação usada por Ehrlich, ser um extrato bruto não purificado, já em 1890, ele foi capaz de estabelecer alguns princípios fundamentais da imunologia (EHRlich, 1891a, 1891b). Por exemplo, através de soro imune antiricina da atividade aglutinante do extrato de ricina, ele demonstrou que existia uma relação quantitativa entre a quantidade de antisoro e o antígeno que poderia ser neutralizado, realizando a primeira determinação quantitativa de anticorpos "in vitro".

Ehrlich mostrou que camundongos foram protegidos contra uma dose letal de ricina, quando submetidos previamente a injeções subcutâneas de pequenas doses do extrato tóxico. Entretanto, soro antiricina não protegeu os animais contra os efeitos tóxicos de extrato tóxico de abrina (Abrus precatorius) e vice-versa. Este experimento evidenciou a especificidade da resposta imune.

Ehrlich também mostrou que a imunidade às toxinas era transferida da mãe para a prole, durante a gestação e através do leite, após o nascimento.

A natureza proteica da ricina foi demonstrada como sendo albumina através de precipitação com álcool por OSBORNE, et al em 1905.

A seletividade das aglutininas vegetais foi evidenciada por LANDSTEINER, & RAUBITSCHER, (1908), quando estabeleceram que a atividade hemaglutinante de vários extratos de sementes foi diferente quando testados com hemácias de diferentes animais. Assim, extrato de semente de ervilha foi muito efetivo em aglutinar hemácias de coelhos, mas pouco efetivo em relação a hemácias de carneiro e pombo, enquanto que hemácias humanas foram fortemente aglutinadas por extratos de feijão e, fracamente aglutinadas por extratos de ervilha e lentilha.

A primeira purificação de aglutinina vegetal foi realizada por SUMNER, (1919), quando obteve a concanavalina (Canavalia ensiformes) através de precipitação salina e cristalização. Este pesquisador, juntamente com HOWELL, em 1936, relataram que além de aglutinar hemácias, a concanavalina A, também precipitava glicogênio em solução e a atividade hemaglutinante era inibida por açúcar de cana, sugerindo que a reação da aglutinina de planta ocorria com carboidratos da superfície das hemácias.

A especificidade das fitohemoaglutininas para diferentes grupos sanguíneos, foi descrita independentemente quase à mesma época, por RENKONEN, (1948) e BOYD & REGUERA, (1949). Relataram que extratos de Phaseolus limensis e Vicia cracca aglutinavam somente hemácias do tipo sanguíneo A, enquanto que extratos de Lotus tetragonolobus aglutinavam hemácias do tipo O. Estes conhecimentos contribuíram de forma relevante para o estabelecimento da base química das substâncias que caracterizam os grupos sanguíneos do sistema ABO.

No começo da década de 50, WATKINS, & MORGAN, (1952) e MORGAN, & WATKINS, (1953) mostraram que a aglutinação de hemácias do

tipo A por extrato de Phaseolus limensis, foi inibida por N-Acetil-D-galactosamina e que a aglutinação de hemácias do tipo O pela lectina de extrato de Lotus tetragonolobus foi inibida pela L-fucose. Eles interpretaram estes achados, como indicativo que estes açúcares são determinantes e conferem especificidades às hemácias A e O respectivamente.

Em 1954, BOYD, & SHAPLEIN, sugeriram que estas aglutininas de plantas até então chamadas de fitohemoaglutininas e que apresentavam especificidade para grupos sanguíneos, fossem denominadas de lectinas, palavra originária do latim *legere*, que significa escolher.

Em 1960, NOVEL, relatou que lectina extraída de semente de feijão (Phaseolus vulgaris), era mitogénica, ou seja, estimulava a mitose de linfócitos.

A atividade de lectinas em aglutinar células neoplásicas foi primeiro demonstrada por AUB, et al (1963).

Métodos de purificação de lectinas foram desenvolvidos e a publicação pioneira foi de AGRAWAL, & GOLDSTEIN, (1965). Estes autores se basearam no fato de que a Concanavalina A, com especificidade para D-glicose, reage com Dextran e desenvolveram uma técnica simples, para o isolamento da lectina, a partir de extrato bruto por meio de adsorção específica em coluna de Sephadex-Dextran seguida de eluição com D-glicose.

Em 1972, EDELMAN, et al, sequenciaram os aminoácidos da Concanavalina A e ao mesmo tempo, independente de outro grupo, HARDMAN & AINSWORTH, (1972), estabeleceram a estrutura tridimensional da Concanavalina A.

A presença de lectinas em mamíferos foi revelada pela primeira vez, por ASHWELL, & MORREL, (1974), quando descreveram a existência de uma proteína hepática específica para D-Galactose, cuja função parece estar relacionada ao metabolismo de glicoproteínas séricas.

A participação de lectinas na aderência bacteriana foi demonstrada pela presença de lectinas específicas para D-manose, em fimbrias, na superfície de microrganismos, como a Escherichia coli (COFEK et al, 1977). Evidência de que estas lectinas estão envolvidas no início do processo infeccioso, foi obtida quando se demonstrou que infecção do trato urinário em camundongos, por Escherichia coli manose específica, poderia ser prevenida por metil-  $\alpha$ -D-manosídeo (ARONSON et al, 1979).

### 2.2.2 - Interação de lectinas e glicoproteínas séricas

Devido a especificidade das lectinas em reagir com resíduos de açúcares e apresentarem mais de um sítio de ligação, podem reagir e precipitar glicoproteínas em solução formando agregados insolúveis lectinas glicoproteínas.

Os primeiros estudos dirigidos a este aspecto das lectinas, foi relatado por NAKAMURA et al (1960), quando verificaram a precipitação de proteínas séricas humanas pelo extrato de sementes de Canavalia ensiformis. Através de eletroforese e difusão em gel de agarose, detectaram reações de precipitação com  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  globulinas e provavelmente com gama globulina.

HARRIS & ROBSON (1963), também observaram reação de extratos de Canavalia ensiformis com proteínas séricas, identificando precipitação de alfa-2-macroglobulina, imunoglobulina M, beta lipoproteína, ceruloplasmina e haptoglobina. Reação também foi detectada com soro de pacientes com macroglobulinemia.

LEON, (1967), estudando a interação de lectina de Canavalia ensiformes com IgM e IgG sérica, numa tentativa de purificação de IgM, entretanto, verificou que outras proteínas séricas além de IgM eram precipitadas.

A lectina de Lens culinaris reage com resíduos de  $\alpha$  D-glicose e  $\alpha$  D-manose (YOUNG, et al, 1971), precipitando diversos componentes glicoprotéicos do soro humano  $\alpha$ -2 macroglobulina, IgM,  $\beta_2$  glicoproteína e traços de IgA e IgG.

A lectina presente no germe de trigo, Triticum vulgare, reage com resíduos N-acetil-glucosamí (GOLDSTEIN & HAYES, 1978), e reage com as proteínas plasmáticas:  $\alpha$ -2macroglobulina complexos haptoglobulina, ceruloplasmina, hemopexina e ácido  $\alpha_1$  glicoprotéico.

### 2.2.3 - Interação de lectinas e glicoproteínas de saliva

Para explicar o mecanismo pelo qual bactérias do gênero *Streptococcus*, se fixam a superfície dos dentes, hipóteses tem sido elaboradas.

ROLLA, et al (1977), propõe que a aderência ocorre primeiramente por atrações eletrostáticas, mediada por ions cálcio, entre elementos com carga elétrica negativa, particularmente ácidos

lipoteicoico da superfície das bactérias e constituintes da superfície dos dentes, também com carga negativa.

Outra hipótese relatada por GIBBONS, (1984), afirma que o Streptococcus mutans, se fixa ao dente através de interações de componentes de sua superfície, denominadas adesinas e substâncias da saliva, presentes na película adquirida, na superfície do esmalte. O acúmulo de microrganismos é favorecido pela síntese de glicanas extracelulares, através da ação de glicosil transferase sobre a sacarose. A ligação das adesinas ocorreria por interação tipo lectina ou forças hidrofóbicas com açúcares presentes nas glicoproteínas da película adquirida, ou com outros receptores nos dentes.

Glicoproteínas com elevado peso molecular apresentam a propriedade de agregar bactérias componentes da placa bacteriana (GIBBONS, & SPINELL, 1970; HAY, et al, 1971; KASHKET & DONALDSON, 1972). Por outro lado glicoproteínas também de alto peso molecular se ligam a hidroxiapatita do esmalte, formando a película adquirida (ERICSON, 1968; SONJU & ROLLA, 1973).

Experimentos realizados por GIBBONS, & QURESHI, (1979), demonstraram que a aderência de 8 cepas de Streptococcus mutans à partículas de hidroxiapatita incubada com saliva foi inibida por galactose, melobiose e algumas aminos. Estes resultados sugerem que adesinas interagem com açúcares presentes nas glicoproteínas da película adquirida.

MIRTH et al (1979) demonstraram que a capacidade da saliva em agregar Streptococcus mutans era inibida, se fosse previamente incubada com lectina de germe de trigo, que apresenta especificidade

para N-acetilglucosamina, e que a adição deste açúcar restaura a atividade agregante.

NONAKA et al (1981), mostraram que a atividade aglutinante da saliva para algumas cepas de Streptococcus mutans foi inibida pela concanavalina A lectina com especificidade para glicose e manose, e a atividade aglutinante da concanavalina A para outras cepas foi inibida pela saliva. Estas interações não foram reproduzidas com outras espécies de bactérias como o Streptococcus mitis e S.sanguis. MIRTH et al (1981), também demonstraram que a atividade agregante da saliva para Streptococcus mutans foi inibida pela concanavalina A e lectina específica para fucose e revertida pela adição do açúcar específico, glicose, manose ou fucose.

A interação de lectinas presentes em alimentos com componentes da saliva humana e Streptococcus mutans, foi estudado por GIBBONS & DANKERS, (1981) quando verificaram que extratos de banana, coco, cenoura, alfafa e semente de girassol reduziram a aderência de Streptococcus mutans à hidroxiapatita adsorvida com saliva, sugerindo que lectinas de alimentos podem interagir com componentes da saliva e Streptococcus mutans.

Através do modelo de grãos esféricos de hidroxiapatita que após incubação com saliva reproduz *in vitro* as condições de película adquirida sobre a superfície dos dentes, GIBBONS & DANKERS, (1982), mostraram que a saliva total inibiu a ligação de concanavalina A, aglutinina de germe de trigo, soja, Ulex europeus e amendoim à partículas de hidroxiapatita tratada com saliva. Observaram ainda que diferentes frações da saliva inibiram diferentes lectinas, tanto na



ligação à hidroxiapatita tratada com saliva, como a atividade hemaglutinante das lectinas. Aglutininas de germe de trigo e amendoim foram inibidas pela saliva, de se ligar a células do epitélio bucal. Os autores sugerem que uma das funções da saliva e outras secreções digestivas seria a de reduzir a interação de lectinas presentes na dieta com a superfície mucosa.

A associação de lectinas de alimentos com células do epitélio bucal, foi relatado por GIBBONS & DANKERS, (1983), quando demonstraram que ao mastigar e ingerir amendoim ou germe de trigo "*in natura*", foi possível detectar as respectivas lectinas em células do epitélio bucal e da língua, sendo reduzidas se as células fossem incubadas com açúcares específicos. Neste trabalho também relataram que a ingestão do germe de trigo ou o pré-tratamento de células epiteliais com a lectina do germe de trigo, aumentou significativamente o número de *Streptococcus sanguis* aderidas às células do epitélio bucal.

Os mesmos pesquisadores GIBBONS & DANKERS, (1986) relataram que após a ingestão de amendoim e ervilha "*in natura*" resultou numa reatividade específica entre imunoglobulina A da parótida com a lectina purificada do alimento, sugerindo que as lectinas tanto reagem com as moléculas de IgA, quanto atuam como antígenos.

Lectinas conjugadas a fluoresceína ou a peroxidase tem sido usadas no estudo de glândulas salivares, epitélio bucal normal e inflamado.

ROLSON et al (1985) usando diversas lectinas conjugadas a fluoresceína, demonstraram que glândula salivar tipo serosa contém glicoproteínas com manose como principal açúcar, enquanto que

glândulas mucosas tem predomínio de fucose e ácido N-acetil-neuramínico nas suas glicoproteínas. Esta diferença entre glândula serosa e mucosa pode ser morfológicamente visualizada pelo tipo de lectina que se liga as células acinares e ao conteúdo dos ductos.

A identificação de receptores para lectinas nas diferentes camadas e estruturas do epitélio bucal normal através de conjugado lectina fluoresceína tem sido estudada por HIETANEN & SALO,(1984).

A demonstração de sítios para ligação de lectinas conjugada a peroxidase, em gengiva inflamada tem sido realizada por MURASE et al (1985).

#### 2.2.4 - Lectina de semente de Jaca. Artocarpus integrifolia - Jacalina

Atividade hemaglutinante do extrato bruto de Artocarpus integrifolia para hemácias de diversas espécies animais, sugeriu a presença de lectinas nesta preparação (MOREIRA & AINOZ,(1978).

Ação mitogénica do extrato de semente de jaca sobre populações linfocitárias foi demonstrado por BUNN-MORENO & CAMPOS-NETTO, (1981), com atividade seletiva sobre células T, comparada a atividade de concanavalina A e sobre células B ação mitogénica não foi expressiva e só ocorreu com concentrações elevadas do extrato.

Ativação policlonal de linfócitos B, pela Jacalina, mostrou atividade superior ao PWM (Pokeweed-mitogen), no estímulo à secreção de

imunoglobulinas (BUNN-MORENO & CAMPOS-NETTO, 1981).

A Jacalina estimula linfócitos humanos em culturas a produzirem gama-interferon (CRANE et al, 1984).

Ao interagir com glicoproteínas humanas, a Jacalina reage com IgA sérica e secretora, através de resíduos de D-galactose, mas não com IgG e IgM (ROQUE-BARREIRA & CAMPOS-NETTO, 1985). Esta propriedade tem sido usada para a purificação de IgA de colostro humano e para a quantificação desta imunoglobulina em colostro humano (ROQUE-BARREIRA & CAMPOS-NETTO, 1984).

A purificação da lectina, Jacalina, no extrato bruto de semente de jaca foi realizada por cromatografia de troca iônica (MOREIRA, & AINGUZ, 1981) e por cromatografia de afinidade através de diferentes meios como: goma de guar (SURESHKUMAR et al, 1982), estroma de hemácias humanas, tipo AB (MOREIRA & OLIVEIRA, 1983). IgA-Sepharose 4B (ROQUE-BARREIRA & CAMPOS-NETTO, 1985) e por agarose D-galactose (ROQUE-BARREIRA et al., 1986).

No levantamento bibliográfico realizado não foram encontrados artigos a respeito da interação de lectina de jaca com glicoproteínas salivares, a não ser comunicações em reuniões científicas (PAULINO DA COSTA & CURY, 1986; PAULINO DA COSTA et al, 1987a; PAULINO DA COSTA et al, 1987b; PAULINO DA COSTA et al, 1988), dos dados parciais deste trabalho.

### 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 - Semente de Jaca (Artocarpus integrifolia)

As sementes foram obtidas de frutas do comércio local. Após remoção da película branca e a escura que envolvem a semente, elas foram conservadas no congelador, à -10°C.

#### 3.2 - Preparação do extrato bruto proteico (EB)

As sementes foram trituradas em liquidificador, por 10 minutos, na proporção de 1g de semente (peso úmido), para 2 ml de solução salina de NaCl 0,15 M, em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,2, contendo 0,01% de azida sódica (solução PBS, a qual foi usada em todos os experimentos).

A extração se processou, em geladeira a 4°C, por 24 horas, com agitação constante. Após filtração em funil de Büchner, com papel de filtro Whatman nº 1, o extrato foi centrifugado a 10.000g por 20 min., a 4°C.

O sobrenadante foi dialisado contra 10 volumes de PBS, por 24 horas a 4°C e após dosagem de proteínas pelo método de LOWRY et al. (1951), usando albumina bovina sérica como padrão, o extrato bruto foi distribuído em alíquotas e conservado no congelador a -10°C.

### 3.3 - Fracionamento do extrato bruto de semente de jaca (EB), através de cromatografia de afinidade

Como descrito por ROQUE-BARRERIRA, M.C. et al (1966), o extrato bruto foi fracionado através de cromatografia de afinidade, usando resina de agarose D-galactose (Seletin 16R, Pierce Chemical Company, USA). Numa seringa de plástico, com 9 mm de diâmetro foram sedimentados 2 ml de resina e lavada com solução de PBS 0,15M contendo 0,01% de azida sódica. Foi aplicado 1 ml de solução de EB, contendo 20 mg de proteínas. O fluxo foi mantido em 0,4 ml/min. As proteínas não ligadas aos resíduos de D-galactose foram eluidas com solução de PBS. Foram coletadas aliquotas de 1 ml e dosado o teor de proteínas, em cada uma, pelo método de LOWRY et al (1951). As aliquotas que continham os maiores teores de proteína foram reunidas, dialisada contra água destilada, em sacos de diálise (Sigma 2,50-7U), na proporção de 1 ml de solução para 10 ml de água, por 24 horas, sob agitação constante, a temperatura ambiente, realizando 3 trocas de água, neste período. Em seguida, foram liofilizados. A reconstituição foi realizada com solução PBS. Esta fração foi denominada Eluato PBS.

A proteína que permaneceu retida na coluna foi eluida com solução de tampão fosfato 0,01 M, pH 7,2, contendo galactose 0,4 M e azida sódica 0,01%, sendo realizado o mesmo procedimento anterior. A fração assim obtida, foi denominada Eluato galactose. Após terminar a eluição com solução de galactose, a coluna foi lavada com 20 ml de solução de PBS 0,15 M, pH 7,2 contendo 0,01% de azida sódica.

### 3.4 - Saliva

#### 3.4.1 - Saliva obtida sem estímulo

Uma mistura de saliva de 5 indivíduos foi coletada sem estímulo, em banho de gelo. A seguir, foi centrifugada a 10.000g, durante 15 minutos, a 4°C e dosado o teor de proteínas pelo método de Lowry(1951).

#### 3.4.2 - Saliva concentrada

A saliva de 10 indivíduos, foi coletada com estímulo de mastigação de Parafilm, em banho de gelo, misturadas e centrifugada a 10.000g por 15 min. a 4°C. Cerca de 90 ml de saliva foram liofilizadas e, dissolvida em 5 ml de água, a qual foi dializada contra 250 ml de solução salina 0,15M em tampão fosfato 0,01 M pH 6,8, durante 24 horas a 4°C, com agitação constante. Em seguida, foi centrifugada a 10.000g por 15 min., a 4°C. Após dosagem de proteínas, foi distribuída em aliquotas e mantidas em congelador a -10°C. Saliva do paciente L.C., portador de imunodeficiência humoral, foi coletada e processada da mesma forma.

### 3.5 - Soro humano

#### 3.5.1 - Soro humano normal

Soro de 30 doadores de sangue (aliquotas de 2 ml) foi misturado, dosado proteína, distribuído em aliquotas e conservados no

congelador a  $-10^{\circ}\text{C}$ .

### 3.5.2 - Soros deficientes em IgA

Soro do paciente L.C foi coletado e processado como o anterior. Soro humano fetal foi obtido do cordão umbelical de 10 recém-nascidos sadios e processado como os anteriores.

### 3.5.3 - Soro de pacientes portadores de hipergamaglobulinemia

Amostras de soro de pacientes portadores de hipergamaglobulinemia, tipo monoclonal, do tipo IgA e IgG, foram obtidas na Prevlab, Laboratório de Análises Clínicas, Piracicaba. Estes soros já haviam sido analisados por eletroforese em agarose e dosado imunoglobulinas através de difusão em placas TRIPARTIGEM<sup>R</sup>. Foi obtido amostra de urina da paciente R.C., portadora de mieloma múltiplo secretor de IgA, tendo sido submetida à mesma análise e dosagens.

### 3.6 - Soro anti IgA humano

Foi utilizado soro de cabra anti IgA humano, cadeia alfa específico do Laboratório LIO-SERUM, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

### 3.7 - Reação de precipitação em meio líquido

#### 3.7.1 - Reação do extrato de sementes de jaca (EB) com glicoproteínas da saliva

Em tubos plásticos foram incubados 1 ml de EB, contendo 0,15 mg/ml de proteínas e igual volume de saliva contendo 1,6 mg/ml de proteínas, em diluição seriadas de 1:1 com fator 2 até 1:16. Os tubos foram mantidos a 37°C por 1 hora e depois a 4°C até completar 12 horas de incubação. Em seguida, foram centrifugados a 10.000g por 15 min. a 4°C, o precipitado foi lavado por centrifugação com PBS pH 6,8, 3 vezes e ressuspendido num volume de 0,5 ml.

A cada tubo contendo 0,25 ml da amostra foi acrescentado 2,5 ml de solução A (cuproalcalina) do reagente de LOWRY. Após 10 min. foi acrescentado 0,25ml da solução B (reduzora) de LOWRY. A leitura foi feita 20 minutos após, em espectrofotômetro a 660nm. Os testes foram realizados em duplicata, para cada diluição e controles para detectar precipitação inespecífica de proteínas da saliva e do EB.

#### 3.7.2 - Reação do extrato de semente de jaca (EB) com glicoproteínas de soro

O procedimento foi semelhante ao realizado para saliva, sendo que o volume de EB foi de 0,5 ml, contendo 1 mg/ml de proteínas e igual volume de diluição do soro humano normal, com 82 mg/ml de proteínas. A diluição seriada com fator 2 foi desde 1:1 a 1:64. Os demais procedimentos foram os mesmos descrito acima para saliva.



### 3.8 - Reação de precipitação em meio semi-sólido - Dupla difusão - em gel de agarose

Em lâminas de microscopia, foram colocados 3,5 ml de agarose a 1% preparada em PBS. Nos orifícios foram aplicados 20 $\mu$ l dos reagentes. A difusão ocorreu em câmara úmida por 24 horas, à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em solução salina isotônica, NaCl a 0,15 M, contendo 0,01% de azida sódica, por 24 horas, com agitação constante. Em seguida colocadas na estufa a 37°C, depois de secas foram coradas com Comassie Blue a 0,05% em metanol (7) ácido acético (25) e água (68), por 2 horas. O excesso de corante foi retirado com a mesma solução sem o Comassie Blue. Todos os procedimentos de coloração foram realizados desta forma.

### 3.9 - Eletroforese em agarose

Em placas de eletroforese Corning, foram aplicadas 1 $\mu$ l das amostras. A eletroforese foi realizada durante 1 hora, a temperatura ambiente, usando 24mA por placa e tampão Barbital 0,05 M pH 8,6. Após a corrida, as placas foram coradas com Comassie Blue, descoradas e secas.

### 3.10 - Imunoeletroforese em agarose

Após a eletroforese, nas canaletas foram colocados 40  $\mu$ l do reagente, saliva ou soro humano. Incubados à 4°C por 24 horas, em câmara úmida lavado com solução de NaCl 0,15 M contendo azida sódica e

0,01% por 24 horas, com agitação. Depois de seco em estufa a 37°C, foram corados com Comassie Blue.

### 3.11 - Eletroforese em gel de Poliacrilamida

As eletroforeses foram feitas basicamente segundo DAVIS (1964), a exceção de que utilizou-se somente o gel separador na concentração de 5%.O tampão de migração foi Tris-glicina 0,005 M, pH 8,3 e azul bromofenol 0,001%, como indicador de corrida. O tempo de migração foi acompanhado pela migração do corante durando em torno de 120 minutos. No início, durante 1 hora, a amperagem foi de 1 mA por tubo até que o corante penetrasse no gel. Em seguida, a amperagem era elevada para 5 mA por tubo. Após a corrida os geis eram corados com Comassie Blue 0,05% por 2 horas. Em seguida, eram descorados.

### 3.12 - Reação de precipitação entre lectinas de semente de jaca e glicoproteínas da saliva e do soro após separação eletroforética em gel de poliacrilamida

Em alguns experimentos, após a migração eletroforética, os geis foram incubados em tubos 1x12 cm, com 6 ml de solução contendo 1mg/ml de proteínas de EB, eluato PBS, eluato galactose, saliva humana normal ou soro humano normal diluídos em PBS; foram mantidos em geladeira à 4°C por 4 dias com agitação manual diária. A seguir os geis foram transferidos para tubos maiores e lavados com 15 ml de PBS, com trocas diárias por 7 dias, com agitação constante à temperatura ambiente. Finalmente foram corados com Comassie Blue.

### 3.13 - Reação de Hemaglutinação

Em placas MICROTITER<sup>®</sup>, foram realizadas diluições seriadas do EB, Eluato PBS e Eluato galactose, em solução de PBS 0,15 M pH 7,2 ou em solução de açúcar 0,3 M, num volume final de 100 microlitros. Foram acrescentados igual volume de suspensão de hemácias a 2%. A incubação ocorreu em câmara úmida, por 24 horas, embora o resultado fosse observado 2 horas após a incubação. O título de aglutinação corresponde à maior diluição que apresenta aglutinação quando comparada aos controles. As hemácias humanas provenientes de doadores de sangue foram obtidas no Banco de Sangue da Santa Casa de Misericórdia de Piracicaba. Após tipagem, 1 ml de hemácias de 5 indivíduos foi misturado, lavada com PBS 3 vezes, por centrifugação e ressuspendido na concentração de 2% em PBS 0,1 M pH 7,2 para teste de aglutinação, ou em solução de açúcar 0,3 M para teste de inibição da aglutinação.

#### 4 - RESULTADOS

##### 4.1 - Fracionamento do extrato bruto (EB), de semente de jaca (Artocarpus integrifolia), através de cromatografia de afinidade.

A eluição das proteínas do EB, da coluna de cromatografia contendo resina Agarose-D-Galactose, resultou dois picos de proteínas, como mostra a figura 1.

As proteínas que foram inicialmente retiradas da coluna, correspondem a fração eluato PBS, eluidos com solução PBS, nos cinco primeiros tubos (5 ml).

A segunda fração, eluato galactose, corresponde às proteínas que ficaram retidas na coluna, e foram eluidas com solução tamponada com fosfato, contendo galactose 0,4M; também foram eluidas nos 5 primeiros tubos.

A eletroforese em agarose das frações obtidas, numa concentração proteica, de 20 mg/ml, revela que a fração eluato galactose apresenta uma única banda de proteína, que permanece no ponto de aplicação, como mostra a figura 2.

O padrão eletroforético da fração eluato PBS, é constituída por quatro bandas de proteínas, três de migração anódica e uma catódica, como mostra a figura 2.

A imuno-eletroforese, contra SAHN e SoHN, evidencia a atividade precipitante desta fração, com glicoproteínas do soro e da

saliva humana, como mostram as figuras 3 e 4.

A imunoeletroforese de eluato PBS também mostra atividade

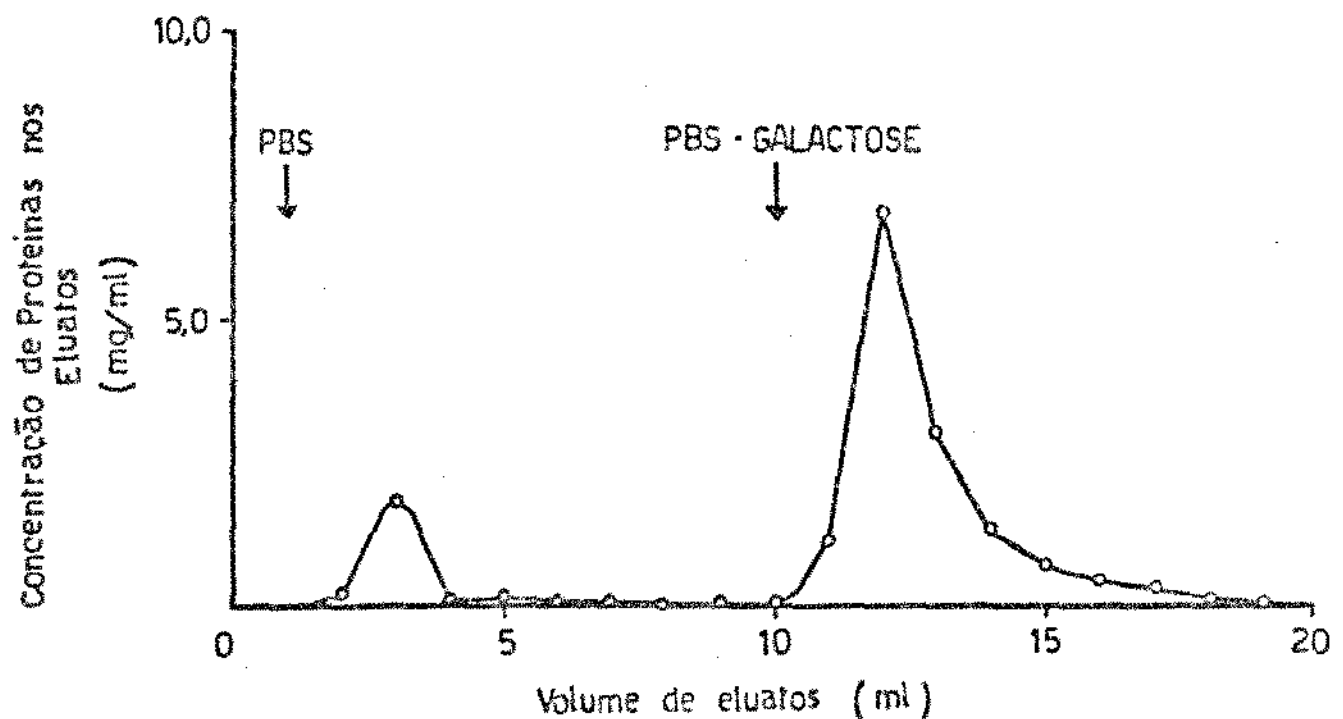


FIGURA 1 - Cromatografia de afinidade em agarose D-galactose. Foram aplicados 20 mg de proteínas de EB, em 1 ml. A eluição foi inicialmente com solução de PBS, seguido de solução de galactose PBS.

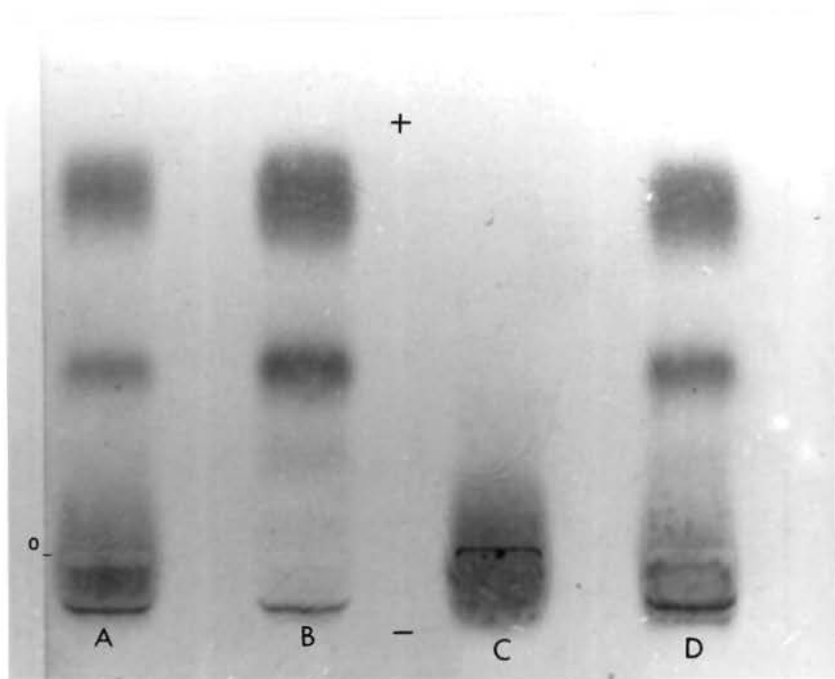


Figura 2 - Eletroforese em placa de agarose do EB e das frações obtidas através da cromatografia.

- A - EB 20mg/ml
- B - Eluato PBS 20mg/ml
- C - Eluato Galactose 20mg/ml
- D - EB 100mg/ml
- 0 - Ponto de aplicação
- + - Anodo
- - Catodo

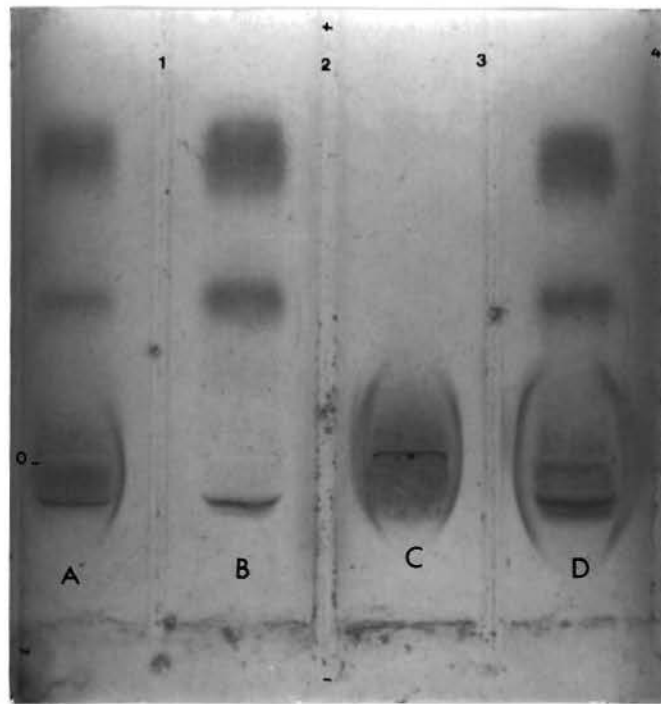


FIGURA 3 - Imunoeletroforese em placas de agarose. Após a migração eletroforético EB e das frações, as canaletas foram preenchidas com saliva e soro.

- A - EB 20mg/ml
- B - Eluato PBS 20mg/ml
- C - Eluato galactose 20mg/ml
- D - EB 100mg/ml

Canaleta 1 e 3 - Saliva humana 1,5 mg/ml  
 2 e 4 - Soro humano 80mg/ml

- 0 - Ponto de aplicação
- + - Anodo
- - Catodo

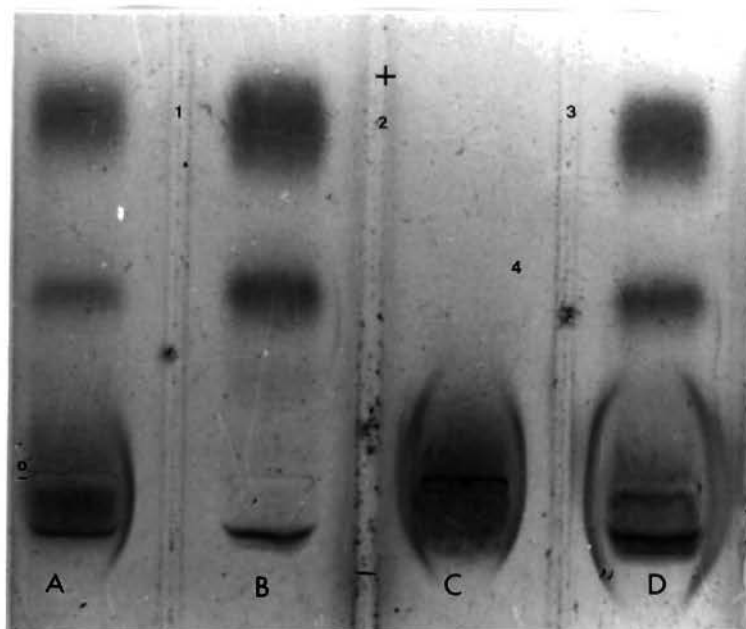


FIGURA 4 - A placa de imunoeletroforese da figura 3, foi superposta a placa de eletroforese da figura 2 permitindo uma melhor visualização das bandas que apresentam atividade precipitante.

- A - EB 20mg/ml
- B - Eluato PBS 20 mg/ml
- C - Eluato Galactose 20mg/ml
- D - EB 100mg/ml

Canaletas 1 e 3 - Saliva humana 1,5mg/ml  
 2 e 4 - Soro humano 80mg/ml

- 0 - Ponto de aplicação
- + - Anodo
- - Catodo



precipitante, da banda de migração intermediária anódica, com glicoproteínas do soro e não com saliva humana. Figuras 3 e 4.

A banda de atividade precipitante do eluato de galactose, é evidenciada no EB, com concentração de proteínas de 20 mg/ml. No entanto, a caracterização simultânea da banda de atividade precipitante do eluado PBS, só foi possível quando se utilizou EB numa concentração de 100 mg/ml. Figuras 3 e 4.

## **4.2 - Reação de precipitação entre lectinas de semente de jaca e saliva humana normal**

### **4.2.1 - Precipitação em meio líquido**

A incubação de 1 ml de EB contendo 0,25mg/ml de proteínas, em diferentes tubos, com igual volume de saliva, em diluições seriadas, a partir da concentração de 1,38mg/ml de proteínas, revelou que a maior precipitação ocorreu com a saliva diluída 4 vezes, correspondendo a uma concentração proteica de 0,35mg/ml, conforme mostra a figura 5. Nestas condições, foi precipitada cerca de 28% de proteínas em solução.

### **4.2.2 - Precipitação em gel de agarose - dupla difusão**

#### **4.2.2.1 - EB e saliva**

Uma linha de precipitação foi detectada, ao reagir saliva

obtida sem estímulo, contendo 1,5mg/ml de proteínas, com EB contendo

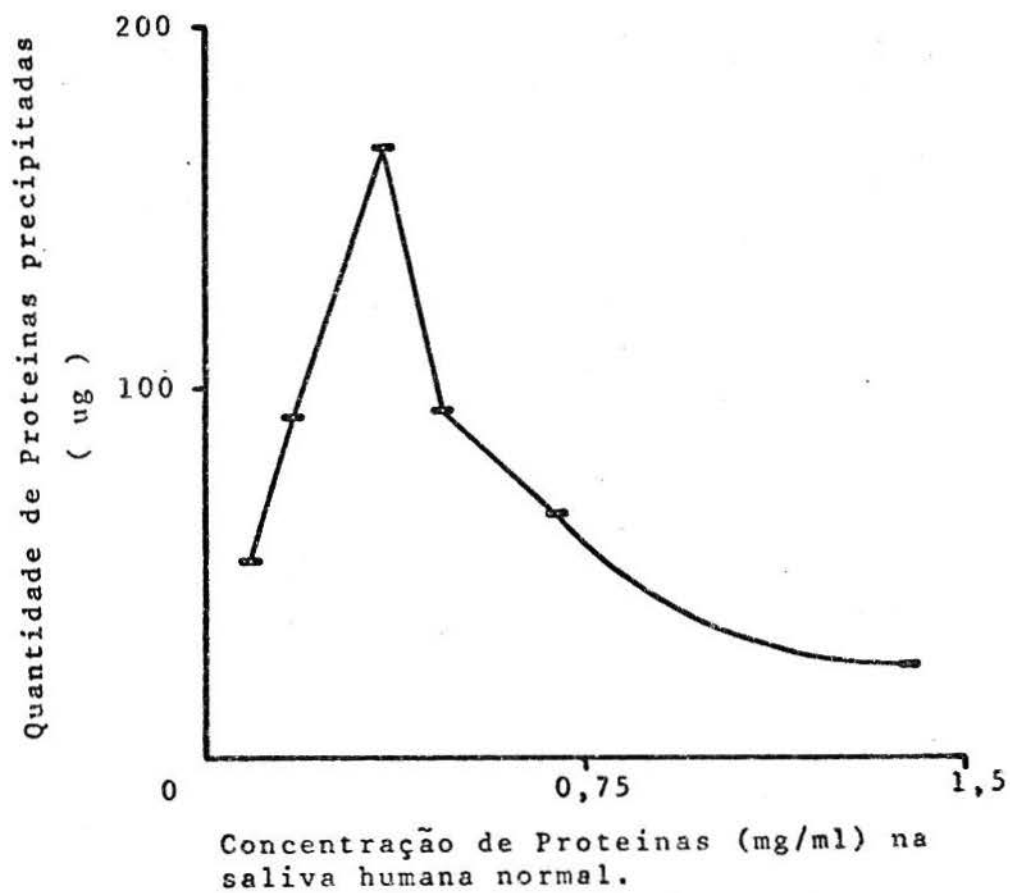


FIGURA 5 - Proteínas (µg) precipitadas em meio líquido após a interação de EB (0,25mg proteínas/ml) com saliva humana normal na concentração proteica de 0,09 a 1,38 mg/ml.

concentrações proteicas que variaram em diluições seriadas de 5mg/ml até 0,625mg/ml.

Usando saliva concentrada 6mg/ml de proteínas e EB com concentrações que variaram em diluições seriadas de 20 até 2,5 mg/ml de proteína, não foram evidenciadas outras linhas de precipitação através de dupla difusão em agarose, como mostra a figura 6 a esquerda.

#### 4.2.2.2 - Eluato galactose e saliva

O aspecto e o número de linhas de precipitação, foi o mesmo obtido com o EB, quando se fez reagir o eluato galactose nas mesmas concentrações do EB, contra saliva contendo 1,5 e 6,0mg/ml de proteínas. Figura 6 a direita.

#### 4.2.2.3 - Eluato PBS e saliva

Nenhuma linha de precipitação foi detectada quando reagiu o eluato PBS, nas mesmas concentrações proteicas de EB contra saliva obtida sem estímulo, com teor de proteínas de 1,5mg/ml e saliva concentrada, contendo 6mg/ml de proteínas. Figura 6 no centro.

## 4.2.3 - Precipitação em gel de poliacrilamida

### 4.2.3.1 - EB e Saliva

Após eletroforese de 300 microgramas de proteína de saliva, o gel foi incubado por 4 dias com EB e lavado com PBS com trocas

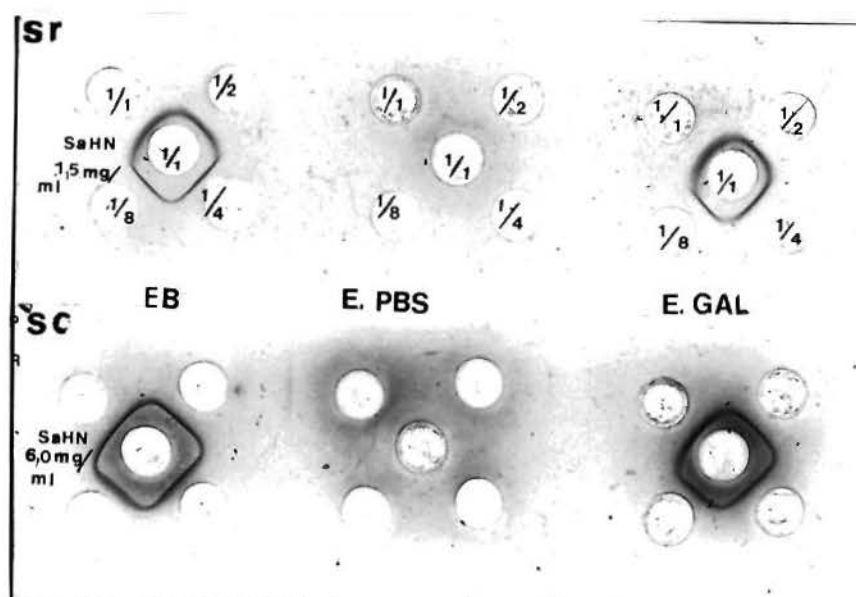


FIGURA 6 - Reação de dupla difusão em gel de agarose entre EB, eluato PBS (E.PBS) e eluato galactose (E.GAL) e saliva humana normal com concentração de 1,5 e 6,0 mg/ml de proteínas.

diárias, por 7 dias com agitação constante. Após corado o gel (xEB) mostra a presença de duas bandas de proteínas na região anódica, com Rm de 0,15 e 0,18, respectivamente, seguido de uma faixa que se estende até o RM 0,47 sem limites precisos, que não foram retiradas pela lavagem, quando comparado ao gel (xSAHN) que foi incubado com a própria saliva, na mesma concentração proteica equivalente ao do EB ou de suas frações, como mostra a figura 7, onde os Rm estão indicados por números e letras ao lado dos géis. Os valores dos Rm estão na tabela abaixo da figura 7.

#### 4.2.3.2 - Eluato PBS e Saliva

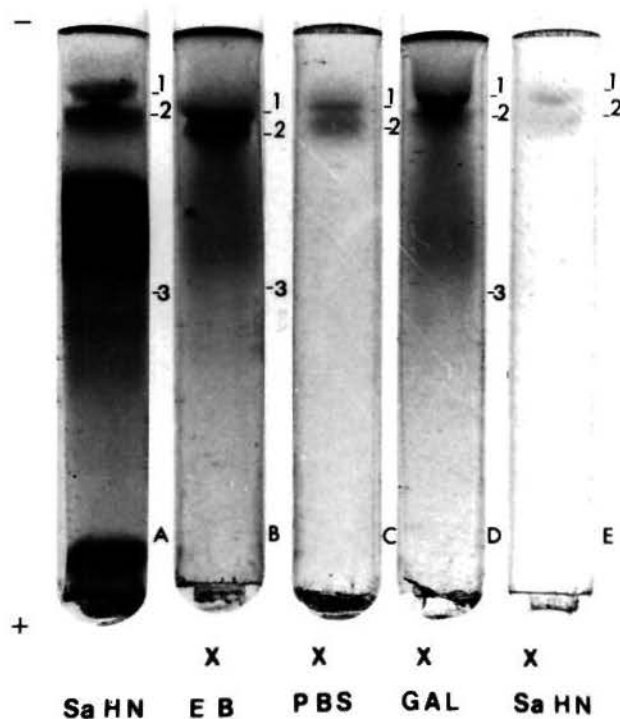
A precipitação em gel de poliácridamida de proteínas da saliva, incubado com eluato PBS (gel x PBS), resultou num padrão semelhante ao controle negativo ou seja lectinas existente nesta fração, não precipitaram glicoproteínas de saliva, nestas condições. Figura 7.

#### 4.2.3.3 - Eluato galactose e Saliva

O padrão de bandas, obtidas ao incubar o gel de poliácridamida, após eletroforese das proteínas de saliva com eluato galactose, (gel x GAL) foi semelhante àquele obtido com a precipitação do EB, como mostra a figura 7.

### 4.3 - Reação de precipitação entre lectinas de semente de jaca e saliva humana deficiente em IgA

A saliva do paciente L.C., portador de deficiência de IgA foi testada através de dupla difusão em gel de agarose, conforme mostra a figura 8.



Valores dos Rm

A, B e D	Rm	C e E	Rm
1	0,15	1	0,15
2	0,18	2	0,18
3	0,47		

FIGURA 7 - Eletroforese em poliacrilamida de proteínas da saliva humana normal, seguido de incubação com soluções de lectina.

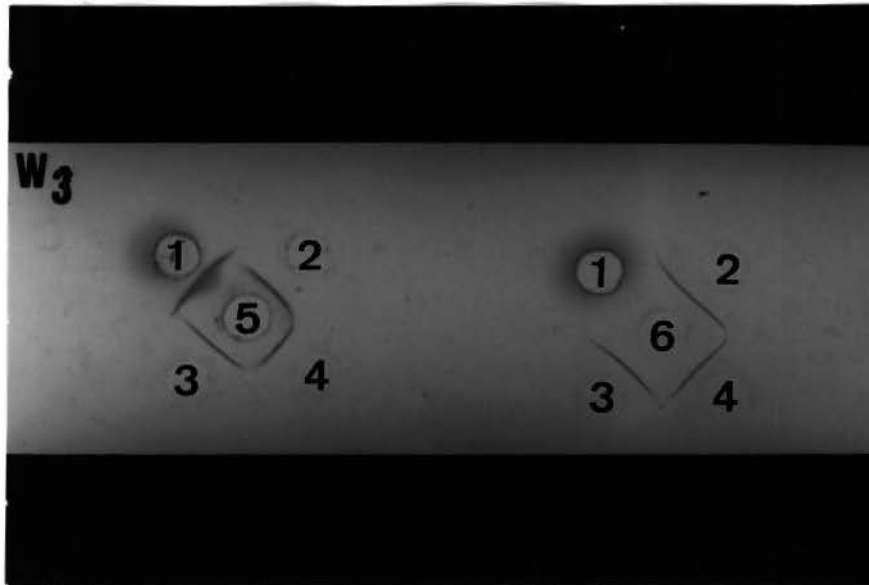


FIGURA 8 - Reação de dupla difusão em agarose entre soro anti IgA, EB, eluato galactose e saliva humana normal e deficiente em IgA (SaLC).

Amostras e concentrações proteicas

- 1 - Soro anti IgA humana
- 2 - EB 5mg/ml
- 3 - EB 2mg/ml
- 4 - Eluato galactose 2mg/ml
- 5 - Saliva humana normal 1,5mg/ml
- 6 - Saliva L.C. deficiente em IgA 1,4mg/ml

A ausência de IgA na SaLC é demonstrada pela não precipitação com soro anti IgA, quando comparado com a saliva humana normal.

A reação da saliva deficiente em IgA e EB, eluato PBS e eluato galactose, mostra os mesmos padrões quando comparado com a saliva humana normal, ou seja, ocorre uma linha de precipitação com EB e eluato de galactose, através de dupla difusão em gel de agarose. A saliva humana normal, quando submetida a fervura por 10 minutos, perde a capacidade de reagir com soro anti IgA, porém ao reagir com EB, mostra uma linha de precipitação semelhante a da saliva que não sofreu desnaturação proteica, como mostra a figura 9.

A figura 10 mostra o padrão eletroforético em poliacrilamida, da saliva LC deficiente em IgA (gel SaLC) e, a precipitação de glicoproteínas desta saliva em gel de poliacrilamida, com EB, (gel x EB), que revela a presença de uma banda de Rm 0,07 na região anódica seguido em direção catódica de uma faixa de limites imprecisos, semelhante a precipitação obtida após incubação com o eluato galactose (gel x GAL). Esta banda foi exacerbada após a incubação, pois era pouco visualizada na eletroforese.

A incubação com eluato PBS (gel x PBS) e o controle em que o gel foi incubado com a própria saliva (gel x SaHN), não revelou a presença de precipitação quando comparado a incubação com EB e eluato galactose.



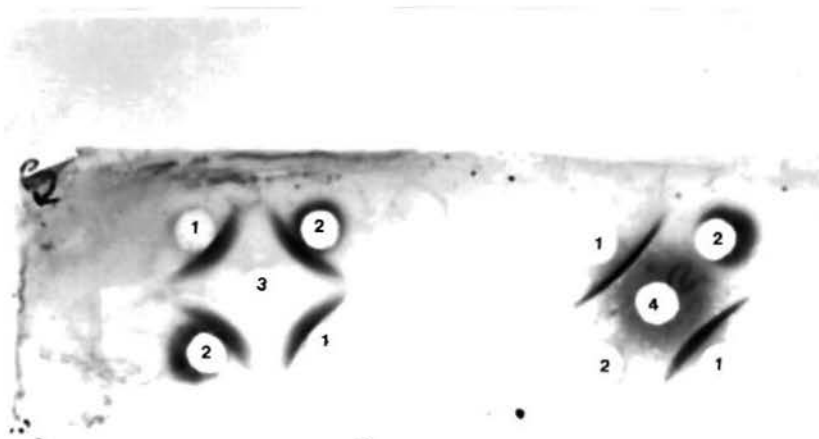
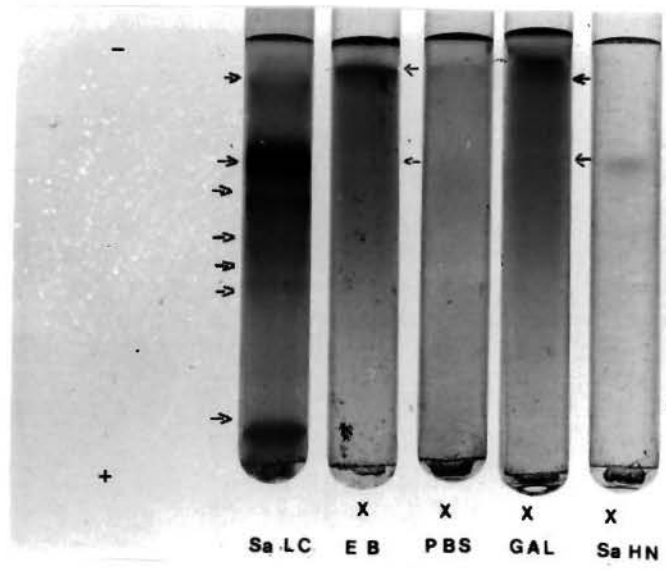


FIGURA 9 - Reação de dupla difusão em gel de agarose, entre soro anti IgA, EB e saliva humana normal, antes e após a fervura.

Amostras e concentrações proteicas

- 1 - EB 5 mg/ml
- 2 - Soro anti IgA
- 3 - SaHN 1,5mg/ml
- 4 - SaHN aquecida



**FIGURA 10** - Eletroforese em poliacrilamida de proteínas da saliva LC, deficiente em IgA, seguida de incubação com soluções de lectina.

#### 4.4 - Reação de precipitação entre lectinas de semente de jaca e glicoproteínas do soro humano normal

##### 4.4.1 - Precipitação em meio líquido

Quando incubado uma quantidade fixa de 0,5ml de solução de EB contendo 1mg/ml de proteínas, com igual volume de diluições seriadas do soro humano, com uma concentração proteica inicial de 80,0mg/ml, verificamos que a maior precipitação ocorreu com soro diluído 16 vezes, quando foram precipitadas cerca de 5% das proteínas, conforme mostra a figura 11.

##### 4.4.2 - Precipitação em gel de agarose. Dupla difusão

###### 4.4.2.1 - EB e soro humano normal

Duas bandas de precipitação foram detectadas através da dupla difusão em agarose. A banda mais evidente está próxima do local de aplicação do soro; a banda menos evidente que está próxima ao ponto de aplicação do EB.

As duas bandas estão presentes, quando o EB foi usado numa concentração de 20mg/ml de proteínas, porém concentrações menores de 10,5 e 2,5mg/ml revelaram apenas a presença da banda próxima ao EB, quando reagiu com igual volume de soro humano normal contendo 80mg/ml de proteínas.

Ao reagir concentrações de 80, 40, 20 e 10mg/ml de proteínas

do soro com igual volume de EB 20mg/ml, ocorre a precipitação, com presença da banda próxima ao soro em todas as concentrações e a presença da banda próxima ao EB até a concentração de 20mg/ml de proteína do soro, como mostra a figura 12.

#### 4.4.2.2 - Eluato PBS e soro humano normal

Foi evidenciado uma banda de precipitação, ao reagir eluato PBS, com 20, 10, 5 e 2,5mg/ml de proteínas, com soro humano contendo 80mg/ml de proteínas. Uma banda também foi evidenciada quando se faz reagir o eluato PBS 20mg/ml com soro humano normal nas concentrações de 40, 20 e 10mg/ml de proteínas. Figura 12.

#### 4.4.2.3 - Eluato galactose e soro humano normal

Uma banda de precipitação próximo ao ponto de aplicação do soro foi detectada ao reagir o eluato de galactose nas concentrações proteicas de 10, 20, 5 e 2,5mg/ml com soro humano normal, contendo 80mg/ml de proteínas. A mesma banda de precipitação foi evidenciada ao reagir o eluato de galactose com o soro humano diluído contendo 40mg/ml e mais fracamente com o soro contendo 20mg/ml de proteínas, conforme mostra a figura 12.

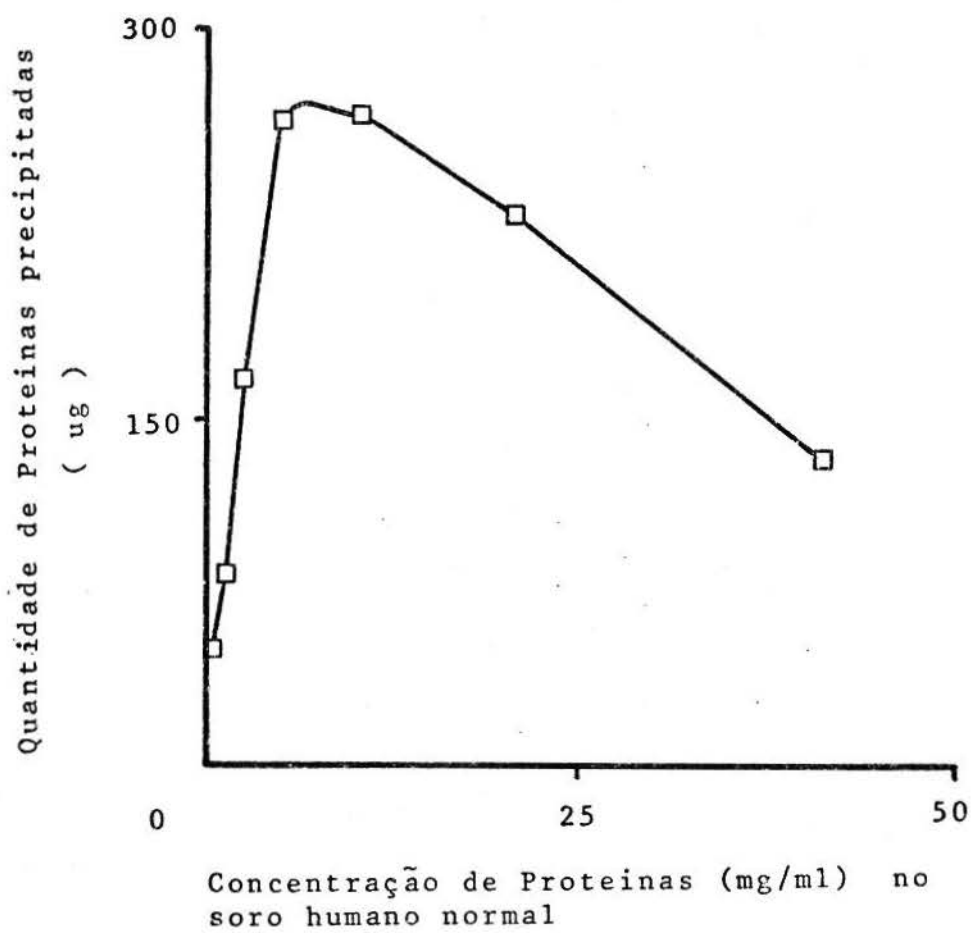


FIGURA 11 - Proteínas precipitadas ( $\mu\text{g}$ ) em meio líquido após a interação de EB (1,0mg/ml) com soro humano normal na concentração proteica de 0,64 a 41,1mg/ml.

#### 4.4.2.4 - Lectinas de semente de jaca e soro humano deficiente em IgA

O soro do paciente L.C., contendo 72mg/ml de proteínas e o soro humano fetal contendo 68mg/ml de proteínas, ambos deficientes em IgA, conforme mostra a figura 13 apresentaram o mesmo padrão de linhas de precipitação ao reagir com igual volume de EB 20mg/ml e com eluato galactose 5mg/ml de proteínas, quando comparadas as linhas de precipitação obtidas com soro humano normal, contendo 80mg/ml de proteínas como mostra a figura 13.

Uma única linha de precipitação foi obtida quando estes soros foram testados com o eluato PBS.

#### 4.4.3 - Reações de precipitação entre lectinas de semente de jaca e glicoproteínas de soro humano após separação eletroforética em gel de poliácridamida

##### 4.4.3.1 - EB e soro humano normal

Após eletroforese de 400 microgramas de proteínas do soro humano normal, o gel (x EB) foi incubado com solução EB, lavado para retirar as proteínas que não reagiram, e corados. Quando comparado com a eletroforese do mesmo soro (gel SoHN), e o controle que foi incubado com proteínas do próprio soro (gel x SoHN) na concentração equivalente à do EB, observamos que algumas das proteínas foram retiradas do gel após a incubação e lavagem, ao passo que outras permaneceram. Os Rm destas proteínas estão indicados por números agrupados pela letra C ao

lado do gel e os valores estão na tabela abaixo da figura 14.

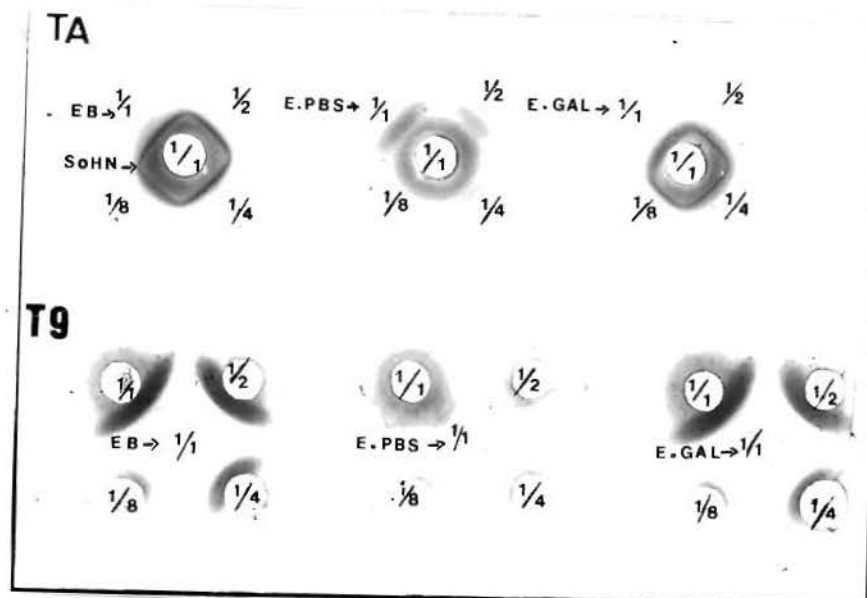


Figura 12 - Reação de dupla difusão em gel de agarose entre EB, eluato PBS (E.PBS), eluato galactose (E.GAL) e soro humano normal (SoHN). As lectinas foram diluidas com fator dois, a partir da concentração proteica de 20 mg/ml e o soro humano normal de 80mg/mo.

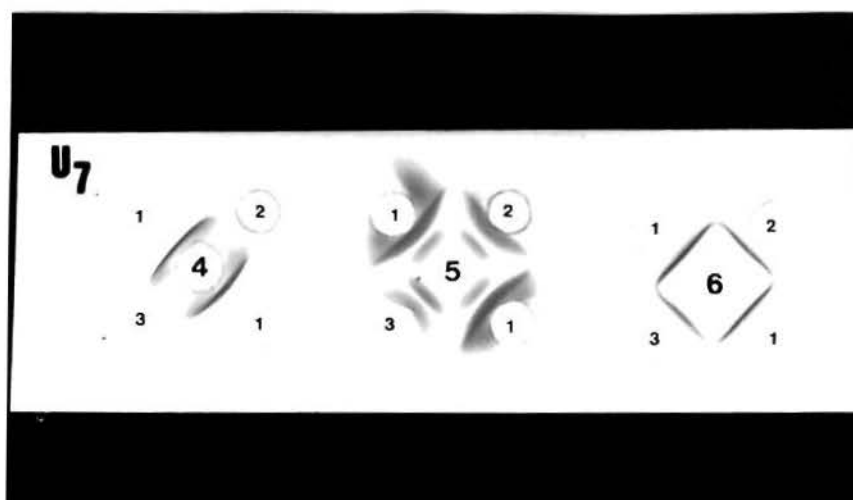


FIGURA 13 - Reação de dupla difusão em gel de agarose entre soro anti IgA, EB e eluato galactose, contra soro humano normal e soros deficientes em IgA, LC e soro humano fetal.

- 1 - Soro humano normal
- 2 - Soro LC,
- 3 - Soro humano fetal
- 4 - Soro anti IgA humano
- 5 - EB
- 6 - Eluato galactose



Dentre as proteínas que permaneceram no gel, a de migração mais anódica foi a de Rm 0,49. Em direção catódica, permaneceram no gel uma faixa de proteínas de limites pouco definidos, que se estende desde o Rm 0,37 até 0,25. Outra faixa de proteínas mais evidente, pode ser observada iniciando no Rm 0,17 e se estendendo até o Rm 0,10. Esta faixa de proteínas está presente no controle incubado com proteínas do próprio soro, porém se localiza mais no centro do gel.

Finalmente uma banda permanece no início do gel, com Rm 0,04 e apresenta as mesmas características no gel incubado com o próprio soro.

#### 4.4.3.2 - Eluato PBS e Soro humano normal

Após a separação eletroforética do SoHN, o gel que foi incubado com o eluato PBS, em seguida lavado para retirar proteínas que não interagiram, mostra a presença de várias bandas de proteínas que permaneceram no gel. Os Rm destas proteínas estão expressos por números agrupados pela letra D ao lado do gel, sua correspondência na eletroforese pela letra A e seus valores estão na tabela abaixo da figura 14.

A banda proteica de maior migração anódica, apresenta-se tênue e sem limites precisos, estendendo-se desde o Rm 0,57 a 0,49. Em direção catódica permaneceram no gel bandas de proteínas com Rm de 0,43; 0,34; 0,28; 0,23; 0,19; uma banda maior que se estende desde o Rm 0,16 até o Rm 0,11, que no gel (x SoHN) incubado com o próprio soro, permanece presente no centro do gel; e a banda no início do gel,

com Rm 0,04 que também está presente no gel controle, não sendo retirada pela lavagem.

#### 4.4.3.3 - Eluato galactose e soro humano normal

O gel (x GAL) incubado com eluato galactose, lavado e corado, apresenta quando comparado ao controle (gel x SoHN), a banda de maior migração anódica, com Rm de 0,49, em direção ao anódo as proteínas que permanecem no gel, corresponde a uma faixa de proteínas que se estende desde o Rm 0,37 ao 0,25. A faixa de proteínas entre o Rm 0,18 a 0,10 e a linha com Rm 0,04, tem o mesmo aspecto do controle incubado com o próprio soro. Os Rm destas proteínas estão indicados por números agrupados pela letra E ao lado do gel e sua correspondência na eletroforese pela letra B. Os valores dos Rm estão na tabela abaixo da figura 14.

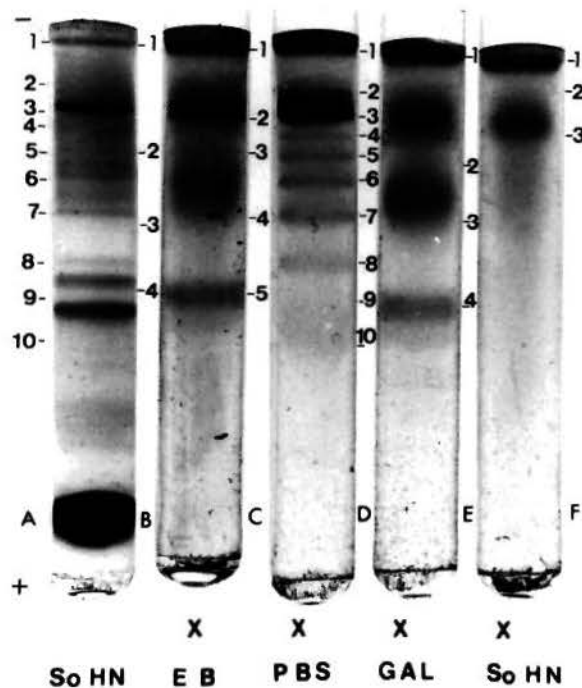
#### 4.4.3.4 - EB e soro deficiente em IgA

Conforme mostra a figura 15, o soro do paciente L.C., após eletroforese e incubação com solução de EB (gel x EB), apresenta as seguintes bandas de proteínas, cujos Rm estão indicados por números agrupados pela letra C ao lado do gel e seus valores estão expressos na tabela abaixo da figura 15. A banda de maior migração anódica tem Rm de 0,49, seguindo em direção catódica; uma faixa tênue com Rm 0,42; uma faixa de limites não definidos, estendendo entre Rm de 0,37 a 0,32; seguido de linhas finas de proteínas que permaneceram no gel,

com Rm de 0,28; 0,23; 0,19; uma banda mais intensa que se estende desde o Rm 0,15 ao Rm 0,09, que no contróle, incubado com o próprio soro, permanece no centro do gel, e finalmente, duas linhas presentes no início do gel, com RM de 0,04 e 0,03 também presentes no contróle, (xSoHN) com as mesmas características.

#### 4.4.3.5 - Eluato PBS e soro deficiente em IgA

O gel de poliacrilamida, após eletroforese de soro deficiente em IgA, ao ser incubado com o eluato PBS (gel x PBS), apresenta várias bandas proteicas cujos Rm estão expressos por números agrupados pela letra D ao lado do gel e sua equivalência na eletroforese pela letra A. Os valores dos Rm estão na tabela abaixo da figura 15. Uma faixa de proteínas fracamente corada, que se estende desde o Rm de 0,58 a 0,46, seguida em direção catódica de bandas de Rm 0,43; 0,34; 0,28; 0,23; 0,19; acentuação da banda de Rm de 0,15 a 0,09; e as linhas que estão presentes no início do gel com Rm de 0,04 e 0,03, semelhante as do gel incubado com soro humano normal, como mostra a figura 15.



Valores dos Rm das bandas proteicas

A e D	Rm	B e E	Rm	C	Rm	F	Rm
1	0,04	1	0,04	1	0,04	1	0,04
2	0,11	2	0,25	2	0,17	2	0,10
3	0,16	3	0,37	3	0,25	3	0,18
4	0,19	4	0,49	4	0,37		
5	0,23			5	0,49		
6	0,28						
7	0,34						
8	0,43						
9	0,49						
10	0,57						

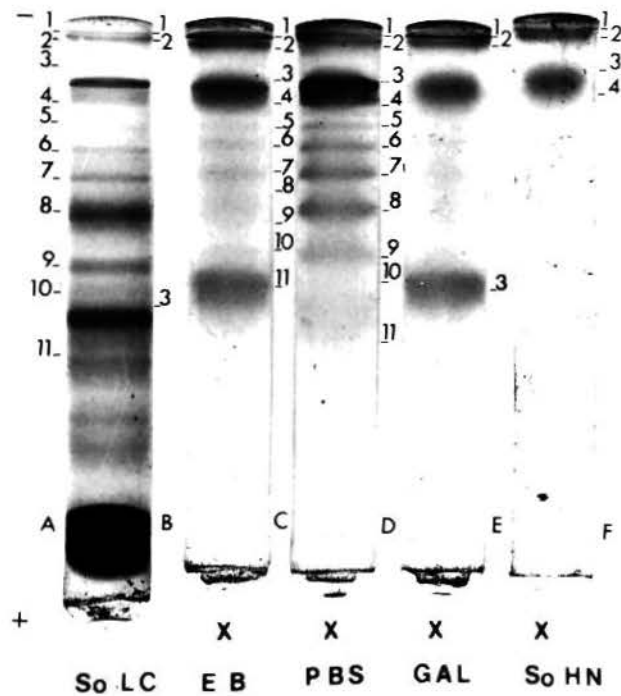
FIGURA 14 - Eletroforese em gel de poliacrilamida de proteínas do soro humano normal seguida de incubação com soluções de lectinas.

#### 4.4.3.6 - Eluato galactose e soro deficiente em IgA

Ao ser incubado o gel de poliacrilamida, após eletroforese de soro deficiente em IgA, com eluato galactose (gel x GAL) apresenta bandas proteicas cujos Rm estão indicados por números agrupados pela letra E e sua correspondência na eletroforese pela letra B. Os valores estão na tabela abaixo da figura 15. Conforme mostra esta figura, a banda de maior migração anódica que permanece no gel, tem Rm de 0,49. As demais apresentam aspecto semelhante ao controle incubado com soro humano normal (gel x SoHN).

#### 4.4.3.7 - EB e soro de mieloma de IgA (R.C.)

Após eletroforese de 200 microgramas de soro de paciente portador de mieloma de IgA (So R.C), o gel incubado com EB (x EB), após lavagem e coloração, apresenta as bandas proteicas cujos Rm estão indicados por números agrupados pela letra C ao lado do gel e sua correspondência na eletroforese pela letra B. Os valores dos Rm estão na tabela abaixo da figura 16. A banda de maior intensidade é a que também apresenta maior migração anódica dentre as proteínas que permaneceram no gel, tem Rm de 0,34 a 0,23, seguido em direção catódica de outra banda com Rm de 0,19 a 0,14; uma linha com Rm 0,09 e uma linhas mais tênue com Rm de 0,06 e uma banda de Rm 0,03 que também está presente no controle (xSoHN) incubado com proteínas do próprio soro como mostra a figura 16.



Valores dos Rm das bandas proteicas

A e D	Rm	B e E	Rm	C	Rm	F	Rm
1	0,03	1	0,03	1	0,03	1	0,03
2	0,04	2	0,04	2	0,04	2	0,04
3	0,09	3	0,49	3	0,09	3	0,09
4	0,15			4	0,15	4	0,15
5	0,19			5	0,19		
6	0,23			6	0,23		
7	0,28			7	0,28		
8	0,34			8	0,32		
9	0,43			9	0,37		
10	0,46			10	0,43		
11	0,58			11	0,49		

FIGURA 15 - Eletroforese em gel de poli-acrilamida de soro LC deficiente em IgA, seguida de incubação com soluções de lectinas.

#### 4.4.3.8 - Eluato PBS e soro de mieloma de IgA (R.C.)

A incubação com eluato PBS do gel após separação eletroforética de proteínas do soro RC (gel x PBS) apresenta após lavagem as seguintes bandas de proteínas cujos Rm estão indicados por números em coluna ao lado do gel agrupados pela letra D e sua correspondência na eletroforese pela letra A. Os valores dos Rm estão na tabela abaixo da figura 16. Permaneceram no gel, bandas com Rm de 0,10; 0,06 e 0,03, conforme mostra a figura 16.

#### 4.4.3.9 - Eluato galactose e soro de mieloma de IgA (R.C.)

O gel incubado com eluato galactose (x GAL), após eletroforese de proteínas do soro RC, apresenta as mesmas bandas proteicas que permaneceram no gel incubado com EB. Os Rm estão indicados por números agrupados pela letra E e os valores estão na tabela abaixo da figura 16.

#### 4.4.3.10 - Eb e soro de mieloma de IgA (G.O.)

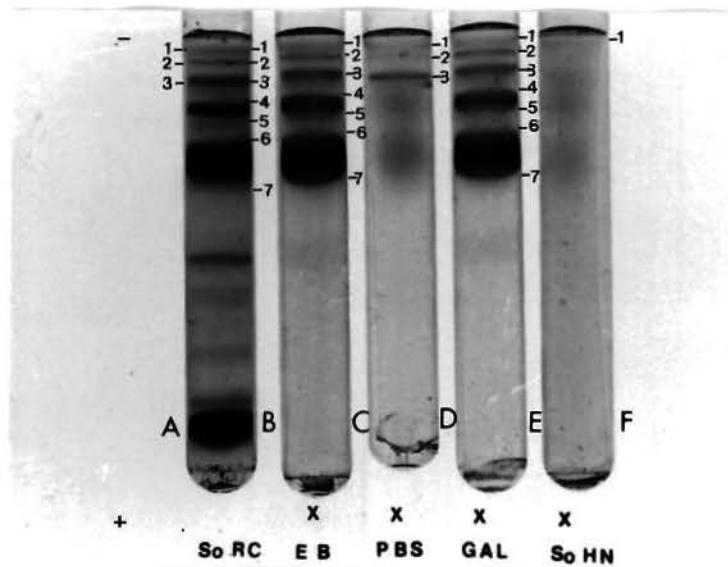
A incubação do gel, após eletroforese de 200 microgramas de proteína do soro do paciente G.O., portador de mieloma de IgA, com EB, seguido de lavagem e coloração mostra, conforme a figura 17, que 5 bandas proteicas permaneceram no gel (x EB). Seus respectivos Rm estão indicados por números agrupados pela letra B e os equivalentes na

eletroforese pela letra A. Os valores dos Rm estão na tabela abaixo da figura 17. A banda de maior migração anódica que permanece no gel apresenta Rm de 0,35, seguido de uma faixa de alta densidade proteica, com Rm de 0,26 a 0,20; esta banda está presente no controle (xSoHN), incubado com o soro humano normal, porém a densidade é menor e está no centro do gel. Outras bandas que permanecem no gel apresentam Rm de 0,12; 0,08, e 0,05. Todas estas bandas exceto a de maior migração anódica, tem no controle o mesmo aspecto que a banda de Rm 0,26 a 0,20, ou seja as proteínas não atingem a periferia do gel.

#### 4.4.3.11 - EB e soro de mieloma de IgG (D.D.)

Após eletroforese de 200 microgramas de proteínas do soro da paciente D.D., portadora de mieloma de IgG, a incubação do gel com EB (x EB), seguido de lavagem e coloração, apresenta três bandas, que permanecem no gel, quando comparado com o controle, onde o gel foi incubado com proteínas do soro humano normal (x SoHN). Os Rm das bandas estão indicados por números agrupados pela letra B ao lado do gel e sua equivalência na eletroforese pela letra A. Os valores dos Rm estão na tabela abaixo da figura 18. A banda de maior migração anódica, apresenta Rm de 0,28, seguida em direção anódica de bandas com Rm de 0,12 e 0,03 sendo que esta última também se encontra no gel controle.

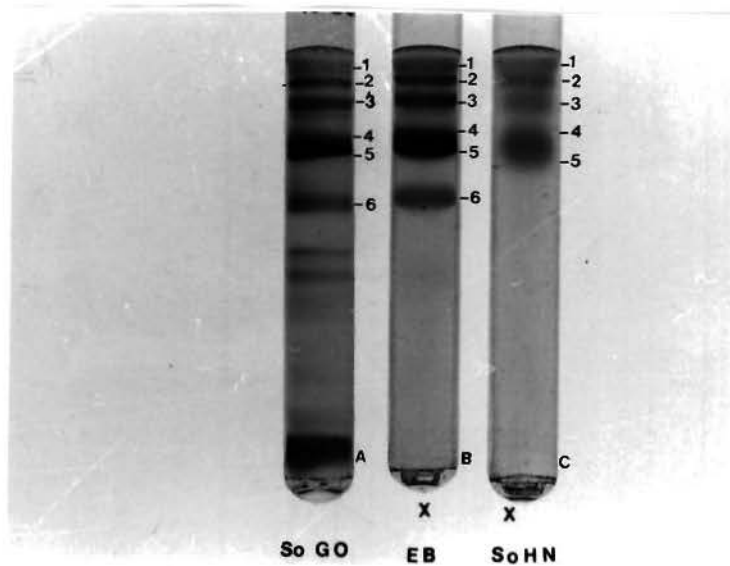




Valores dos Rm das bandas proteicas

A e D	Rm	B C e E	Rm	F	Rm
1	0,03	1	0,03	1	0,03
2	0,06	2	0,06		
3	0,10	3	0,10		
		4	0,14		
		5	0,19		
		6	0,23		
		7	0,34		

FIGURA 16 - Eletroforese em poliacrilamida de proteínas do soro RC de paciente com mieloma de IgA, seguida de incubação com soluções de lectinas.



Valores dos Rm das bandas proteicas

A e B	Rm	C	Rm
1	0,05	1	0,05
2	0,08	2	0,08
3	0,12	3	0,13
4	0,20	4	0,18
5	0,26	5	0,27
6	0,35		

FIGURA 17 - Eletroforese em poliacrilamida de proteínas do soro GO de paciente com mieloma de IgA seguida de incubação com soluções de lectinas.

Porém a proteína de maior densidade proteica, presente na eletroforese, foi totalmente retirada após a incubação e lavagem, conforme mostra a figura 18.

#### 4.4.4 - Reação de precipitação entre EB e glicoproteínas de urina de paciente (R.C.) portadora de mieloma de IgA, após separação eletroforética em gel de poliacrilamida

A eletroforese da urina da paciente R.C., mostrou a presença de seis bandas proteicas.

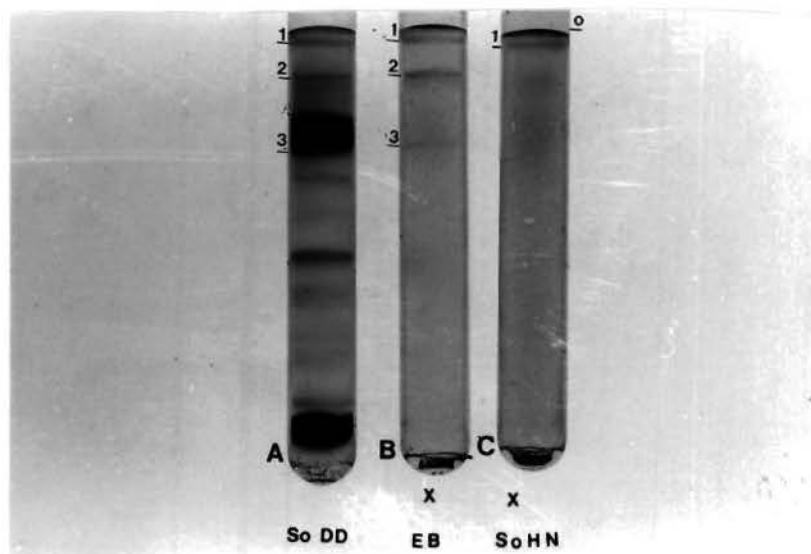
Quando o gel, após eletroforese foi incubado com solução de EB, lavado e corado, permaneceu no gel, uma banda proteica que se estende desde o Rm 0,38 ao Rm 0,28 e uma linha de Rm 0,18, quando comparado ao controle que foi incubado com proteínas do soro humano normal como mostra a figura 19. Os Rm estão indicados por números agrupados pela letra B ao lado do gel e sua equivalência na eletroforese pela letra A. Os valores dos Rm estão na tabela abaixo da figura 19.

#### 4.5 - Reação de hemaglutinação entre lectinas de semente de jaca (A.integrifolia) e hemácias humanas

##### 4.5.1 - Especificidade de grupo sanguíneo ABO

A reação de hemaglutinação realizada com EB, a partir de uma

concentração de 25 microgramas/ml de proteínas em diluições seriadas, apresentou aglutinação até o título de 1/128 que corresponde a uma concentração proteica de 0,019 microgramas de proteínas/ml de solução de EB, tanto para hemácias do grupo sanguíneo A, B e O.



Valores dos Rm das bandas proteicas

A e B	Rm	C	Rm
1	0,03	1	0,03
2	0,12		
3	0,28		

FIGURA 18 - Eletroforese em poliacrilamida do soro DD de paciente portador de mieloma de IgG seguida de incubação com soluções de lectinas.

O eluato PBS foi testado a partir de uma concentração proteica inicial de 1000 microgramas de proteínas/ml, apresentou uma aglutinação até a diluição de 1/4, que corresponde a concentração proteica de 250 microgramas/ml, tanto para hemácias do grupo sanguíneo A, B e O.

O eluato galactose apresentou um título aglutinante, semelhante ao do EB, nas mesmas concentrações proteicas, tanto para hemácias A, B e O, como mostra a figura 20.

#### 4.5.2 - Inibição da hemaglutinação de com açúcares

##### 4.5.2.1 - EB e Eluato galactose

Nestes testes foram usados uma mistura de hemácias A, B e O para preparar a suspensão de hemácias usadas na hemaglutinação.

O EB e o eluato galactose, a partir de uma concentração proteica de 25 microgramas/ml, apresentaram um título aglutinante até a diluição de 1:128.

Quando a reação ocorreu numa solução contendo galactose 0,3M, inibiu completamente a aglutinação como mostra a figura 20. Em testes anteriores já havíamos observado que a aglutinação é positiva até a concentração proteica de 50 microgramas/ml, e inibida a partir de 25 microgramas/ml.

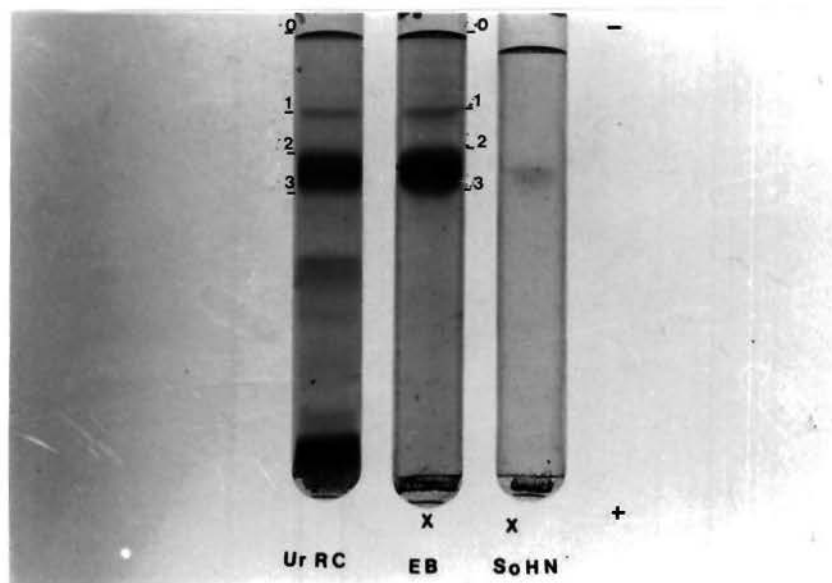
A reação de hemaglutinação num meio contendo solução de glicose 0,3M, diminuiu o título hemaglutinante para 1:16, que corresponde a uma concentração proteica de 1,56 microgramas/ml como

mostra a figura 20.

A presença de lactose no meio de reação inibiu a aglutinação 1:2, que corresponde a uma concentração proteica de 12,5 microgramas/ml.

#### 4.5.2.2 - Eluato PBS

A partir de uma concentração proteica inicial de 1000 microgramas/ml, o eluato PBS que aglutina até a diluição 1/4, foi totalmente inibida a aglutinação quando acrescentado solução de galactose e lactose 0,3M e a solução de glicose 0,3M inibiu a aglutinação a partir da diluição 1:4, que corresponde a uma concentração proteica de 250 microgramas/ml ou seja, inibiu apenas o valor de uma diluição.



Valores dos Rm das bandas proteicas

A e B	Rm
1	0,18
2	0,28
3	0,38

FIGURA 19 - Eletroforese em poliacrilamida de proteínas da urina RC de paciente portador de de mieloma de IgA, seguida de incubação com soluções de lectinas.

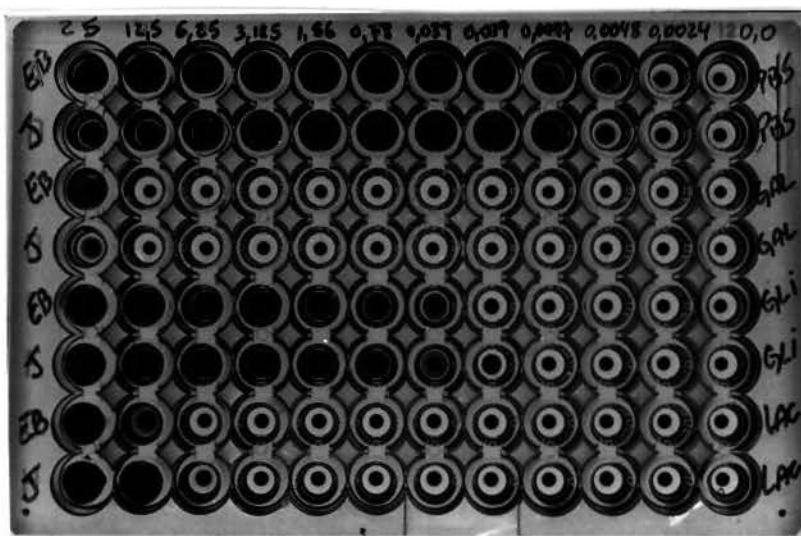


FIGURA 20 - Hemaglutinação de hemácias humanas ABO, por EB, eluato galactose (Jacalina) e inibição da hemaglutinação por galactose, glicose e lactose.

A esquerda estão assinaladas as soluções que foram diluídas: extrato bruto (EB) e eluato galactose (J). Em cima estão expressos as concentrações proteicas de cada diluição em  $\mu\text{g/ml}$ . A direita estão indicados os meios nos quais ocorreram as reações em solução PBS, galactose, glicose e lactose.



## 5 - DISCUSSÃO

Como descrito anteriormente lectina do extrato bruto (EB) de semente de jaca reagia e precipitava glicoproteínas do soro humano, e uma vez que em secreções como o colostro, apenas a IgA era precipitada (ROQUE-BARREIRA & CAMPOS-NETO, 1985), no presente trabalho estudamos a interação deste extrato bruto, com glicoproteínas da saliva, usando o soro como referência.

Através da reação de precipitação em meio líquido, verificamos que proporcionalmente, o EB precipita mais glicoproteínas da saliva que do soro humano, e que esta interação segue os princípios da reação antígeno e anticorpo, com ponto de equivalência onde ocorre a maior precipitação, região de excesso de lectina e excesso de glicoproteínas (Fig. 5 e 11).

Através de reação de dupla difusão em gel de agarose a reação do EB com glicoproteínas de saliva revelou apenas uma linha de precipitação, tanto com saliva concentrada quanto a obtida sem estímulo, com menor concentração proteica (Fig. 6).

Para testarmos a especificidade da reação do EB com IgA da saliva e do soro humano, usamos material de paciente portador de hipogamaglobulinemia e soro humano fetal, deficiente nesta proteína e verificamos as mesmas linhas de precipitação obtidas com saliva e soro contendo IgA, sugerindo que outras glicoproteínas tanto da saliva quanto do soro reagiam com lectinas presentes no EB (Fig. 8 e 13).

Após realizarmos os testes iniciais de interação de extrato bruto de semente de jaca (A.integrifolia), com glicoproteínas de saliva e soro, procuramos obter a lectina purificada.

Através de cromatografia de afinidade, com agarose-D-galactose (Selectin 16<sup>R</sup>, Pierce USA), conforme descrito por ROQUE-BARREIRA et al (1986b), obtivemos fracionamento do extrato bruto. As frações obtidas foram dialisadas e concentradas através de liofilização. O teste de pureza relativa escolhido foi o de eletroforese em agarose e a comprovação da atividade precipitante da lectina foi realizado através de imunoeletroforese contra proteínas de saliva e de soro, comparados ao extrato bruto inicial.

O método usado para o fracionamento do EB, permitiu a obtenção de uma banda proteica, eluída com solução de galactose, que permanece próximo ao ponto de aplicação correspondendo a cerca de 63% das proteínas do EB, quando analisada através de eletroforese em agarose. Sua atividade precipitante foi confirmada através de imunoeletroforese contra proteínas do soro e da saliva (Fig. 2 e 3).

Ao realizarmos a eletroforese das demais frações que não foram retidas na coluna, verificamos que o rendimento foi total em retirar a lectina com especificidade para galactose do extrato bruto.

Esta fração, que não foi retida na coluna, eluída com solução PBS, após concentração, e submetida a eletroforese e imunoeletroforese contra proteínas do soro e saliva, revelou uma linha de precipitação entre a fração de menor migração anódica e proteínas do soro humano normal. Esta fração corresponde a 7% das proteínas do EB sendo purificados no eluato PBS, houve um aumento de concentração para 32%, resultados de densitometria, não mostrado neste trabalho, o que permitiu evidenciar a atividade de lectina com propriedade precipitante desta banda proteica do extrato bruto, a qual foi

confirmada quando foram usadas maiores concentrações proteicas do EB para eletroforese e imunoeletroforese. A presença de mais de uma lectina no extrato bruto de jaca, tinha sido sugerido anteriormente (CROQUE-BARREIRA & CAMPOS-NETO, 1985; MOREIRA, & AINOZ, 1981). A presença desta outra lectina pode ser sugerida quando se realizou a dupla difusão em gel de agarose, usando o EB e soro humano normal, ocorrem duas linhas de precipitação, uma mais intensa próximo do EB e outra que só está presente quando se usa concentração acima de 20 mg/ml de proteínas do EB. Este fato pôde ser confirmado usando a lectina purificada com galactose e a fração eluida com solução PBS, da coluna de cromatografia, em que se verifica a presença de linhas distintas de precipitação com cada uma delas, ao reagir com soro humano normal (Fig. 12).

Nas condições testadas, apenas a lectina com especificidade para galactose reagiu com glicoproteínas de saliva humana normal.

A partir de evidências que mais de uma glicoproteína da saliva e do soro humano reagem com as lectinas do EB, procuramos uma técnica adequada para comprovar esta hipótese. A imunoeletroforese em agarose da saliva e soro humano, contra EB e suas frações não mostraram linhas de precipitação, em várias titulações, ocorrendo apenas manchas imprecisas.

Como a eletroforese em gel de poliacrilamida fornece maior separação das proteínas, optamos após separação eletroforética das proteínas do soro, urina e saliva pela incubação do gel com a solução de EB e suas frações, seguido de lavagens com solução de PBS até que fossem retiradas dos géis as proteínas que não reagiram com as

lectinas. Para melhor evidenciação dos complexos lectina-proteínas precipitados os géis foram corados.

Através desta técnica foi possível demonstrar que o EB e o eluato galactose reagem com duas bandas e uma faixa de proteínas da saliva humana normal (Fig. 7), enquanto que com a saliva L.C. deficiente em IgA mostra a presença de uma única banda proteica, que inclusive foi exacerbada quando comparado a eletroforese (Fig. 10). Este resultado está de acordo com a observação de SCHRAGER & OATES,(1971) quando demonstraram que a principal glicoproteína da saliva total contém galactose como principal açúcar e tem especificidade de grupo sanguíneo, sugerindo que as lectinas do EB não reagem apenas com IgA da saliva.

Quanto ao soro humano, usando a eletroforese, seguida de incubação com EB e suas frações, permitiu confirmar que mais de uma glicoproteína reage com lectinas presentes no EB.

A incubação do gel com o eluato PBS evidencia cerca de 6 bandas de proteínas que permanecem no gel após a lavagem, enquanto que com o eluato galactose permanece no gel uma faixa e uma banda proteica, quando comparado ao controle (Fig. 14).

O soro L.C., deficiente em IgA, através desta técnica, mostrou o mesmo número de bandas proteicas quando incubado com eluato PBS e apenas uma banda, com o eluato galactose (Fig. 15).

Soro de pacientes portadores de mieloma múltiplo, após eletroforese e incubação com EB e frações, mostraram aspectos diferentes conforme a classe de imunoglobulina.

O soro da paciente R.C., portadora de mieloma de IgA, que

apresenta uma banda de alta concentração proteica na região catódica, provavelmente correspondendo à IgA, após incubação e lavagem, foi exacerbada quando incubada com EB e eluato galactose, porém foi eliminada quando incubado com o eluato PBS e o controle (Fig. 16).

A eletroforese de proteínas da urina da paciente R.C. mostrou uma banda de alta concentração proteica com Rm semelhante ao da provável paraproteína presente no soro, que reagiu com lectinas do EB. A presença desta proteína na urina provavelmente está relacionado à insuficiência renal que a paciente apresentou (Fig. 19).

O soro do paciente G.O., também portador de mieloma de IgA, quando incubado com EB, exacerbou a banda proteica de maior concentração presente na região catódica, provavelmente correspondendo à paraproteína, que foi diminuída no controle (Fig. 17).

O soro da paciente D.D., portadora de mieloma de IgG, quando submetido ao mesmo tratamento, mostra que lectinas presentes no EB, não reagem com esta proteína, pois a banda de proteína que deve corresponder IgG, não permaneceu no gel, após incubação com o EB (Fig. 18). Estes resultados confirmam que no EB a lectina que reage com a IgA é a com especificidade para galactose e como tem sido demonstrado, os mielomas testados são de IgA subclasse 1, como descrito por KONDOH et al (1986).

A técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, de proteínas da saliva e soro humano, seguido de incubação com soluções lectinas parece ser específica conforme os resultados obtidos, quando comparados aos controles, onde apenas as proteínas de maior peso molecular que permanecem na região catódica não são totalmente

retiradas pela lavagem, porém as demais bandas foram totalmente eliminadas e exacerbadas quando incubadas com lectinas, devido provavelmente à reação específica de lectinas com glicoproteínas no gel de poliacrilamida, impedindo que sejam retiradas durante a lavagem.

Esta técnica não foi adequada para evidenciar a atividade de lectinas no EB, quando submetido a eletroforese, seguido de incubação com proteínas do soro e saliva, provavelmente devido ao elevado peso molecular das glicoproteínas que não conseguem penetrar no gel.

A reação da lectina, com açúcares de glicoproteínas pode ser confirmada no experimento, que mostrou reatividade do EB, mesmo após fervura da saliva, quando as proteínas simples são desnaturadas porém as altamente conjugadas são preservadas (Fig. 9).

Os testes de hemaglutinação demonstram que o EB apresenta alto título hemaglutinante que corresponde ao da sua principal lectina, com especificidade para galactose (Fig. 20). Nenhuma das lectinas é específica para grupos sanguíneos do sistema ABO.

A lectina presente no eluato PBS tem proporcionalmente baixo título hemaglutinante.

A galactose e a lactose inibem a hemaglutinação tanto do EB como do eluato galactose quando comparado à glicose nas mesmas concentrações molares. A pequena inibição produzida pela glicose provavelmente é consequência da semelhança molecular com a galactose (Fig. 20).

A inibição da hemaglutinação produzida pelos açúcares galactose, glicose e lactose, no eluato PBS, provavelmente é

inespecífica pois durante o fracionamento as lectinas presentes nesta fração não foram retidas na coluna de Agarose-D-galactose.

## 6 - RESUMO

Lectinas são proteínas que se ligam a açúcares específicos de macromoléculas. Foram descritas inicialmente em plantas, porém de outras fontes já foram isolados como bactérias, animais e até mesmo mamíferos. As lectinas apresentam várias propriedades como hemaglutinação, aglutinação de bactérias, protozoários, leucocitos, estímulo mitogênico para linfócitos e entre outras a reação e precipitação de glicoproteínas, incluindo imunoglobulinas.

As glicoproteínas constituem um grande grupo de substâncias presentes na saliva e soro, dentre elas a imunoglobulina A. Tem sido descrito que lectina de semente de jaca reage com IgA presente no soro e secreções humanas.

Neste trabalho procuramos verificar se a lectina de semente de jaca, específica para galactose, reagia com imunoglobulina A, salivar, e se era específica para esta glicoproteína, comparando as reações com as glicoproteínas do soro. Através de técnicas de dupla difusão em gel de agarose, eletroforese em gel de agarose e poliacrilamida, com saliva e soro deficiente em imunoglobulina A, verificamos que esta lectina reage com outras glicoproteínas da saliva e do soro além da imunoglobulina A.

Após o fracionamento do extrato bruto de semente de jaca, por cromatografia de afinidade em agarose-D-galactose, verificamos a existência de outra lectina neste extrato, não específica para galactose, com atividade precipitante para várias proteínas do soro humano.



As proteínas da saliva e soro separadas eletroforéticamente em géis de poliacrilamida reagem com soluções de lectinas. A reação é específica, pois as proteínas que apresentam afinidade para as lectinas ficam imobilizadas, enquanto que outras se difundem do gel quando em soluções tampões. Esta técnica mostrou-se adequada para o estudo de glicoproteínas da saliva e soro humano normal e patológico.

## 7 - SUMMARY

Interaction of lectins of jack seeds *Artocarpus integrifolia*, with salivary and human serum glycoproteins.

Lectins are proteins which bind to specific saccharides in polysaccharides, glycoproteins or glycolipids. Although originally described in plants, they have been isolated from many diverse sources like bacterias and animal including smalls, sponges, fish and others. The lectins have many biological activities like erythrocyte bacterial, protozoal, leukocytes agglutination, produce mitogenic effect on lymphocyte culture, and precipitate glycoproteins, as the immunoglobulins.

The glycoproteins are important group in the salivary and serum components, included immunoglobulin A.

Our aim was determine if the lectin of jack seed (galactose specific) reacts specifically with salivary immunoglobulin A when compared with serum glycoproteins. Through double agar diffusion and electrophoretic separation in agarose and polyacrylamide gels of IgA deficient saliva and serum, we observed that other glycoproteins present in saliva and serum react with this lectin.

The fractioned crude extracts of jack seeds by affinity chromatography with agarose-D-galactose resulted in a lectin specific to galactose. The other proteins that didn't bind to galactose, also react and precipitate various serum proteins.

The salivary and serum proteins separated in disc

polyacrylamide gels react with lectins solutions. The reaction is specific because only some proteins are retained into gel after repeated wash in buffer. This procedure was shown to be useful for study normal and pathological human salivary and serum glycoproteins.

## 8 - CONCLUSÕES

A análise dos resultados deste trabalho permitiu serem formuladas as seguintes conclusões:

1 - Lectina de semente de jaca interage com glicoproteínas salivares.

2 - A interação das lectinas de semente de jaca não é seletiva e exclusiva para IgA salivar, não sendo adequada para quantificar esse anticorpo na saliva.

3 - As proteínas salivares e séricas separadas eletroforéticamente em geis de poliacrilamida reagem especificamente com soluções de lectinas. Esta técnica mostrou-se viável, podendo ser um meio adequado como diagnóstico auxiliar em casos patológicos.

4 - O fracionamento do extrato bruto por cromatografia de afinidade permite identificar outra lectina que reage com glicoproteínas do soro humano, em acréscimo à jacalina.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, B.B.L. and GOLDSTEIN, I.J. Specific binding of concanavalin A to cross-linked dextran gels. Biochem.J., 96:23C-5C, 1985.
- ARNOLD, R.R.; RUSSEL, J.E.; CHAMPION, W.J. and GAUTHIER, J.J. Bactericidal activity of human lactoferrin: influence of physical conditions and metabolic state of the target microorganism. Infect.Immun., 32(2):655-60, 1981.
- ARONSON, M.; MEDALIA, O.; SHORI, L.; MIRELMAN, D.; SHARON, N. and OFEK, I. Prevention of colonization of the urinary tract of mice with *Escherichia coli* by blocking of bacterial adherence with methyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside. J.Infect.Dis., 139(3):329-32, Mar, 1979.
- ASHWELL, G. and MORELL, A.G. The role of surface carbohydrates in the hepatic recognition and transport of circulating glycoproteins. Adv.Enzymol., 41,99-128m 1974.
- AUB, J.C.; TIESLAU, C. and LANKESTER, A. Reactions of normal and tumor cell surfaces to enzymes, I. wheat-germ lipase and associated mucopolysaccharides. Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 50:613-9, 1963.
- BAENZINGER, J. and KORNFELD, S. Structure of the carbohydrate units of IgA<sub>1</sub> immunoglobulin. I. Composition, glycopeptide isolation, and structure of the asparagine-linked oligosaccharide units. J.Biol.Chem., 249(22):7260-9, Nov., 1974a.
- Structure of the carbohydrate units of IgA<sub>1</sub> immunoglobulin. II. Structure of the O-glycosidically linked oligosaccharide units. J.Biol.Chem., 249(22):7270-81, Nov., 1974b.
- BORTNER, C.A.; MILLER, R.D. and ARNOLD, R.R. Bactericidal effect of lactoferrin on *Legionella pneumophila*. Infect.Immun., 51(2):373-7, Feb., 1986.
- BOYD, W.C. and REGUERA, R.M. Hemagglutinating substances for human cells in various plants. J.Immunol., 62:333-9, 1949.
- and SHAPVLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). Science, 119:419, 1954.
- BUNN-MORENO, M.M. and CAMPOS-NETO, A. Lectin(s) extrated from seeds *Artocarpus integrifolia* (jackfruit): potent and selective stimulator(s) of distinct human T and B Cell functions. J. Immunol., 127(2):427-9, Aug., 1981
- CLAMP, J.R. and PUTNAM, F.W. Glycopeptides of immunoglobulins. Investigation on IgA myeloma globulins. Biochem J., 103:425-9, 1967.

- CLEN, W.H. and KLEBANOFF, S.J. Inibitory effect of saliva on glutamic acid accumulation by Lactobacillus acidophilus and the role of the lactoperoxidase-thiocyanate system. J.Bacteriol., 91(5):1848-53, May, 1966.
- CRANE, I.; LEUNG, H.; BARWICK, S.; PARTI, S. and MEAGER, A. The preparation of interferon gamma-producing T-Cell hybridomas from jacalin stimulated T. lymphocytes and the SH9 T-Cell Line. Immunoly., 53:855-9, 1984
- DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. II. Method and applications to human serum proteins. Ann.N.Y.Acad.Sci., 121:407-27, 1964.
- DELACROIX, D.L.; DIVE, C.; RAMBAUD, C. and VAERMAN, J.P. IgA subclasses in various secretions and in serum. Immunology, 47:383-5, 1982.
- EDELMAN, G.M.; CUNNINGHAM, B.A.; REEKE, G.N. Jr.; BECKER, J.W.; WAXDAL, M.J. and WANG, J.L. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 69(9):2580-4, Sept., 1972.
- EHRlich, P. Experimentalle untersuchungen über immunitat. I. Über ricin. Dtsch.Med.Wochenschr., 17:976-9, 1891a. Apud SHARON, N. and LIS, H. A Century of lectin research. TIBBS, (12):488-91, 1987.
- Experimentalle untersuchungen über immunitat. II. Über abrin. Dtsch.Med.Wochenschr., 17:1218-19, 1891b. Apud SHARON, N. and LIS, H. A Century of lectin research. TIBBS, (12):488-91, 1987.
- ERICSON, T. Salivary glycoproteins. Composition and adsorption to hydroxylapatite in relation to the formation of dental pellicles an calculus. Acta.Odontol.Scand., 26:3-21, 1968.
- \_\_\_\_\_ and MAKINEN, K.K. Saliva: formation, composition and possible role. In: THYSTRUP, A. and FEJERSKOV, O. Textbook of Cariology. Munksgaard, Copenhagen, 1986, p.28-32.
- \_\_\_\_\_ and RUNDEGREN, J. Characterization of salivary agglutinin reacting with a serotype c strain of Streptococcus mutans. Eur.J.Biochem., 133:255-61, 1983.
- GIBBONS, R.J. Adherent interactions wich may affect microbial ecology in the mouth. J.Dent.Res., 63(3):378-85, Mar., 1984.
- \_\_\_\_\_ and DANKERS, I. Lectin-like constituents of foods wich react with components of serum, saliva and Streptococcus mutans. Appl.Envirom.Microbiol., 41(4):880-88, Apr., 1981.
- \_\_\_\_\_ Inhibition of lectin-binding to saliva-treated hydroxypatite, to buccal epithelial cells, and to erithrocytes by salivary components. Am.J.Clin.Nutr., 36:276-83, Aug., 1982.

- GIBBONS, R.J. and DANKERS, I. Association of food lectins with human oral epithelial cell in vivo. Archs.oral Biol., 28(7):561-66, 1983.
- \_\_\_\_\_ Immunosorbent assay of interactions between human parotid immunoglobulin A and dietary lectins. Archs.oral Biol., 31(7):477-81, 1986.
- \_\_\_\_\_ and URESCHI, J.U. Inhibition of adsorption of Streptococcus mutans strains to saliva-treated hydroxyapatite by galactose and certain amines. Infect.Immun., 26(3):1214-17, 1979
- \_\_\_\_\_ and SPINELL, D.M. Salivary induced aggregation of plaque bacteria. In: Mc.HUGH, W.D. Dental Plaque. Livingstone, Edinburg, 1970, 207-16.
- \_\_\_\_\_ STOPPELAAR, J.D. and HARDEN, L. Lysozyme insensitivity of bacteria indigenous to the oral cavity of man. J.dent.Res., 45(3):877-81, 1966.
- GOLDSTEIN, I.J. and HAYES, C.E. The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. Adv.Carbohyd.Chem.Biochem., 35:127-340, 1978.
- HALPERN, M. and KOSHLAND, M.E. Novel subunit in secretory IgA. Nature, 228(26):1276-8, 1970.
- HARDMAN, K.D. and AINSWORTH, C.F. Structure of concanavalin A, at 2.4-A resolution. Biochemistry, 11(26):4910-19, 1972.
- HARRIS, H. and ROBSON, E.B. Precipitin reaction between extracts of seeds of Canavalia ensiformis (Jack bean) and normal and pathological serum proteins. Vox Sang., 8:348-, 1963.
- HAY, D.I.; GIBBONS, R.J. and SPINELL, D.M. Characteristics of some high molecular weight constituents with bacterial aggregating activity from whole saliva and dental Plaque. Caries Res., 5:111-23, 1971.
- \_\_\_\_\_ and OPPENHEIM, F.G. The isolation from human parotid saliva of a further group of proline-rich proteins. Arch.oral Biol., 19:627-32, 1974.
- HIETANEN, J. and SALO, O.P. Binding of four lectins to normal human oral mucosa. Scand.J.Dent.Res., 92:443-7, 1984.
- HOERMAN, K.C.; ENGLANDER, H.R. and SHKLAIR, I.L. Lysozyme: its characteristics in human parotid and submaxillo-lingual saliva. Proc.Exp.Biol.Med., 92:875-78, 1956.
- HOWARD, K.I.; SAGE, H.J. and STEIN, M.D. Studies on a phytohemagglutinin from the lentil. II. Multiple forms of Lens culinaris hemagglutinin. J.Biol.Chem., 246(6):1590-95, Mar., 1971.

- KASHKET, S. and DONALDSON, C.G. Saliva-induced aggregation of oral streptococci. J.Bacteriol., 112(3):1127-33, Dec., 1972.
- KILIAN, M. and BRATTHAL, D. Caries immunology. In: THYLSTRUP, A. and FEJERSKOV, O. Textbook of Cariology. Munksgaard, Copenhagen, 1986, p.167-76.
- \_\_\_\_\_ ; THOMSEM, B.; PETERSEN, T.E. and BLEEG, H. Occurrence and nature of bacterial IgA proteases. Ann.N.Y.Acad.Sci., 490:612-24, 1983.
- KONDOH, H.; KOBAYASHI, K., HAGIWARA, K. and KAJII, T. Jacalin, a jackfruit lectin, precipitates IgA<sub>1</sub> but not IgA<sub>2</sub> subclass on gel diffusion reaction. J.Immunol. Meths., 88:171-73, 1986.
- LANDSTEINER, K. and RAUBITSCHKEK, H. Beobachtungen über hemolyse and hamagglutination. Zentralbl. Bakteriolog., 45:660-67, 1908. Apud SHARON, N. LIS, H. A Century of lectin research. TIBBS, 12:488-91, 1987.
- LEGLER, D.W.; MCGHEE, J.R.; LINCH, D.P.; MESTECKY, J.F.; SHAFFER, M.E.; CARSON, J. and BRADLEY, Jr. E.L. Immunodeficiency disease and dental caries in man. Archs.oral Biol., 26:905-10, 1981.
- LEON, M.A. Concanavalin A reaction with human normal immunoglobulin G and myeloma immunoglobulin G. Science, 158:1325-26, 1967.
- LEVINE, M.J. and ELLISON, S.A. Immuno-electrophoretic and chemical analyses of human parotid saliva. Archs.oral Biol., 18:539-53, 1973.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FAAR, A.L. and RANDAL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J.Biol.Chem., 193:265-75, 1951.
- MCGHEE, J.R.; MICHALEK, S.M.; WEB, J.; NAVIA, J.M.; RAHMAN, F.R. and LEGLER, D.W. Effective immunity to dental caries: protection of gnotobiotic rats by local immunization with Streptococcus mutans. J.Immunol., 114(1):300-5, Jan., 1975.
- MESTECKY, J. Immunoglobulin M and secretory immunoglobulin A: presence of a common polypeptide chain different from light chains. Science, 171:1163-65, 1971.
- MIRTH, D.B.; MILLER, C.J.; KINGMAN, A. and BOWEN, W.H. Inhibition of saliva-induced aggregation of Streptococcus mutans by wheat germ agglutinin. Caries Res., 13:121-31, 1979.
- \_\_\_\_\_ Binding of salivary aggregating factors for Streptococcus mutans by concanavalin A and fucose-binding protein. Caries Res., 15:1-6, 1981.
- MOREIRA, R.A. and AINOZ, I.L. Isolectins from jackfruit (Artocarpus integrifolia) seeds. Plant.Physiol., 61: suppl. 118, 1978.



- MOREIRA, R.A. and AINOZ, I.L. Lectins from seeds of jackfruit (*Artocarpus integrifolia*): isolation and purification of two isolectins from the albumin fractions. Biol.Plant., 23(3):186-92, 1981.
- \_\_\_\_\_ and OLIVEIRA, J.T.A Lectins from the genus *Artocarpus*. Biol.Plant., 25(5):343-48, 1983.
- MORGAN, W.T.J. and WATKINS, W.M. The inhibition on the hemagglutinins in plant seeds by human blood-group substances and simple sugars. Br.J.Exp.Pathol., 34:94-103, 1953.
- MORHART, R. and FITZGERALD, R. Composição e ecologia da flora bucal. In: MENAKER, L. Cáries Dentárias. Bases Biológicas. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1984, 232-44.
- MURASE, N.; HOSAKA, M.; TAKAI, Y.; TANIMURA, T. and MORI, M. Histochemical demonstration of lectin-binding sites and keratin in inflamed human gingiva. J.Period.Research, 20:625-36, 1985.
- NAKAMURA, S.; TANAKA, K. and MURAKAWA, S. Specific protein of legumes which reacts with animal proteins. Nature, 188(8):144-5, 1960
- NEWBRUM, E. Cariology. 2<sup>a</sup> Ed. Baltimore Willians & Wilkins, USA, 1983, p.17-43.
- NONAKA, H.; YOSHII, J.; NAKAMURA, R. and TSUNEMITSU, A. The effects of human saliva and concanavalin A on the agglutination of oral streptococci. Archs.oral Biol., 26:127-30, 1981.
- NOWELL, P.C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes. Cancer Res., 20:462-6, 1960.
- OFEK, I.; MIRELMAN, D. and SHARON, N. Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptor. Nature, 263: 623-5, 1977.
- ORAN, J.D. and REITERX, B. Inhibition of bacteria by lactoferrin and other iron-chelating agents. Biochem.Biophysis.Acta, 170:351-63, 1968.
- OSBORNE, T.B.; MENDEL, L.B. and HARRIS, I.F. A study of the proteins of the castor bean with special reference to the isolation of ricin. Am.J.Physiol., 14:259-66, 1905.
- PAULINO DA COSTA, C. & CURY, J.A. Interação de lectinas com glicoproteínas salivares. Anais da SBPqO, 2:108, 1986.
- \_\_\_\_\_ ; MORAL, N.J. & CURY, J.A. Interação entre jacalina e glicoproteínas do soro e saliva. Arq.Biol. e Tecnol., 30(1): 44, 1987a.
- \_\_\_\_\_ Purificação de lectina de jaca e sua interação com glicoproteínas salivares e séricas. Anais da SBPqO. 3:105, 1987b.

- PAULINO DA COSTA, C.; MORAL, J.C. & CURY, J.A. Purificação de lectinas de jaca e sua interação com glicoproteínas salivares e séricas. Arq.Biol.Tecnol., 31(1): 114, 1988.
- RENKONEN, K.O. Studies on hemagglutinin present in seeds of some representatives of family of leguminosae. Ann.Med.Exp.Biol.Fenn., 26:6672, 1948. Apud SHARON, N. and LIS, H. A century of lectin research. TIBBS, 12:488-91, 1987.
- RÖLLA, G.; ROBRISH, S.A. and BOWEN, W.A. Interaction of hydroxyapatite with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. Acta Pathol.Microbiol.Scand.Sect.B., 85:341-6, 1977.
- ROQUE-BARREIRA, M.C. and CAMPOS-NETO, A. A method for the determination of secretory IgA using the lectin jacalin. Brazilian J.Med.Biol.Res., 17(5-6):384, 1984.
- \_\_\_\_\_. Jacalin: an IgA-binding lectin. J.Immunol., 134(3): 1740-3, Mar., 1985.
- \_\_\_\_\_; COSTA, J.C. and CAMPOS-NETO, A. Determination of secretory IgA levels in human colostrum and milk by radial precipitation with jacalin. Brazilian J.Med.Biol.Res., 19(4-5):646A, 1986a.
- \_\_\_\_\_; GREENE, L.Y. and CAMPOS-NETO, A. Purification of jacalin on agarose-D-galactose. Brazilian J.Med.Biol.Res., 19(4-5):638A, 1986b.
- \_\_\_\_\_; PRAZ, F.; HALBWACHS-MECARELLI, L.; GREENE, L.J. and CAMPOS-NETO, A. IgA-affinity purification and characterization of the lectin jacalin. Brazilian J.Med.Biol.Res., 19:149-57, 1986c.
- SHARON, N. and LIS, H. Glycoproteins: research booming on long-ignored ubiquitous compounds. Mol.Cellul.Biochem., 42:167, 1982.
- \_\_\_\_\_. A century of lectin research. TIBBS, 12:488-91, Dec., 1987.
- SCHRAGER, J. and OATES, M. D. G. The isolation and partial characterization of the principal glycoprotein from human mixed saliva. Archs oral Biol., 16:287-303, 1971.
- SONJU, T. and RÖLLA, G. Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hours on cleaned human teeth in vivo. Caries Res., 7:30-8, 1973.
- STILLMAX, H. Über ricin, ein giftiges ferment aus den samen von *Ricinus comm.* L. und einigen anderen Euphorbiaceae. Inaug. Diss., Dopart, 1888. Apud SHARON, N. and LIS, H. A century of lectin research. TIBBS, 12:488-91, 1987.

- SUMNER, J.B. The globulins of the jack bean *Canavalia ensiformis*. J.Biol.Chem., 37:137-42, 1919. Apud SHARON, N. and LIS, H. A century of lectin research. TIBBS, 12:488-91, 1967.
- \_\_\_\_\_ and HOWELL, S.F. The identification of the hemagglutinin of the jack bean with concanavalin A. J.Bacteriol., 32(2):227-37, 1936.
- SURESHKUMAR, G.; APPUKUTTAN, P.S. and BASU, D.  $\alpha$ -D-galactose-specific lectin from Jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) seeds. J.Bio.-Science, 4:257-61, 1982.
- TANZER, J.M.; HAGEAGE, G.J. and LARSON, R.H. Variable experiences in immunization of rats against *Streptococcus mutans* - associated dental caries. Archs.oral Biol., 18:1425-39, 1973.
- TAUBMAN, M.A.; SMITH, D.J. and MURRAY, R. Immunoglobulin susceptibility to proteolytic effects of human dental plaque extracts. Archs.oral Biol., 23:949-55, 1978.
- TOLSON, N.D.; DALEY, T.D. and WYSOCKI, G.P. Lectin probes of glycoconjugates in human salivary glands: 1. J.oral Pathol., 14:523-30, 1985.
- TWETMAN, S.; LINDNER, A. and MODEER, T. Lysozyme and salivary immunoglobulin A in caries-free and caries-susceptible pre-school children. Swed.Dent.J., 5:9-14, 1981.
- WATKINS, W.M. and MORGAN, W.T.J. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. Nature, 169,(4307):825-6, May, 1952.
- YOUNG, N.M.; LEON, M.A. and TAKAHASHI, T. Studies on a phytohemagglutinin from the lentil. III. Reaction of *Lens culinaris* hemagglutinin with polysaccharides, glycoproteins and lymphocytes. J.Biol.Chem., 248(6):1596:601, 1971.
- ZENGO, A.N.; MANDEL, T.D.; GOLDMAN, R. and KHURANA, H.S. Salivary studies in human caries resistance. Archs.oral Biol., 16:557-60, 1971..