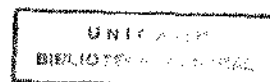


ANA MARIA SELL

INFLUÊNCIA DAS LECTINAS PHA, DE *Phaseolus vulgaris*, WGA, DE GERME DE TRIGO E JACALINA, DE *Artocarpus integrifolia*, NO PROCESSO DE REPARAÇÃO TECIDUAL DE PELE DE RATOS

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciências - Área de Concentração: Biologia e Patologia Buco-Dental.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro - 1998



INFLUÊNCIA DAS LECTINAS PHA, DE *Phaseolus vulgaris*, WGA, DE GERME DE TRIGO E JACALINA, DE *Artocarpus integrifolia*, NO PROCESSO DE REPARAÇÃO TECIDUAL DE PELE DE RATOS

ANA MARIA SELL
Farmacêutica - Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. **CELSO PAULINO DA COSTA**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciências – Área de Concentração: Biologia e Patologia Buco- Dental.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro - 1998

Ficha Catalográfica

Se48i Sell, Ana Maria.
Influência das lectinas PHA, de *Phaseolus vulgaris*, WGA,
de germe de trigo e jacalina, de *Artocarpus integrifolia*, no
processo de reparação tecidual de pele de ratos / Ana Maria Sell.
Piracicaba, SP : [s.n.], 1998.
116f. : il.

Orientador : Prof. Dr. Celso Paulino da Costa.
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Lectinas. 2. Cicatrização de feridas. 3. Inflamação.
4. Células - Cultura. I. Costa, Celso Paulino da. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba.
III. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 26 de Novembro de 1998, considerou a candidata ANA MARIA SELL aprovada.

1. Prof. Dr. CELSO PAULINO DA COSTA Pelo Paulino da Costa

2. Prof. Dr. LUCIANO RESENDE FERREIRA Luciano Resende Ferreira

3. Prof. Dr. LUIS CARLOS SPOLIDORIO Luis Carlos Spolidorio

4. Profa. Dra. ALBA REGINA MONTEIRO SOUZA BRITO Alba Regina

5. Prof. Dr. PEDRO DUARTE NOVAES Pedro Duarte Novaes

Ao meu esposo **Antônio Carlos**

Ao meu filho **Eduardo**

A minha irmã **Sandra**

e a minha mãe **Alaíde** (in memoriam)

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao professor orientador Dr. Celso Paulino da Costa, por motivar este trabalho, pela orientação com amizade e pela grande confiança depositada;

Ao professor Mário Roberto Vizioli pelos ensinamentos, pelas sugestões e orientação nas análises histológicas da reparação;

Ao professor Ricardo Della Coleta pelos ensinamentos e apoio durante a realização dos experimentos de cultura de fibroblastos e pela amizade;

Aos professores Luciano Resende Ferreira, Luís Carlos Spolidorio, Pedro Duarte Novaes e Alba R. Monteiro Souza Brito pelas valiosas contribuições durante a defesa;

Aos professores José Francisco Hoffling e Luciane Cruz Lopes Araújo pelas valiosas sugestões e contribuições;

Aos professores José Francisco Hoffling, Jaime Aparecido Cury e Oslei Paes de Almeida por terem possibilitado a realização de diversos procedimentos experimentais em seus laboratórios;

Aos amigos e colegas de pós-graduação Edvaldo A. Ribeiro Rosa, Alessandra S. Campos, Denise Spolidorio e os demais não citados nominalmente, pela amizade, convívio e apoio;

Aos funcionários Wilma C. Ferraz, pelo auxílio no manuseio com os animais de laboratório, Adriano L. Martins e Sr. Paulo Amaral pelo auxílio na confecção das lâminas microscópicas, Elza M. Tomazini, Anderson Laerte Teixeira, Waldomiro Vieira Filho e Marisa de Jesus Carlos Soares pelo apoio e pela amizade;

Aos colegas professores Jeane Eliete Laguila Visentainer, Luiza Tamie Tsuneto, Márcia Machado de Oliveira Dalalio, Sueli Donizete Borelli, Ricardo Alberto Moliterno e Rafael Campos Bezerra, pela amizade e pelo apoio;

Ao meu esposo Antônio Carlos Andrade Gonçalves pelo apoio em todos os momentos e pelo auxílio nas análises e confecção dos gráficos, e às demais pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

À Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Análise Clínicas, pela liberação para a realização deste curso de pós-graduação;

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, pela oportunidade de realização deste curso;

À CAPES/PICD, pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	
RESUMO.....	1
INTRODUÇÃO.....	3
REVISÃO DE LITERATURA.....	6
I- Reparo.....	6
II- Lectinas.....	11
II.1- Fitohemaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i> (PHA).....	17
II.2- Lectina de germe de trigo (WGA).....	19
II.3-Jacalina e Artocarpina.....	20
OBJETIVOS.....	25
I- Objetivos Gerais.....	25
II- Objetivos Específicos.....	25
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
I- Obtenção das lectinas.....	27
I.1- Preparo da matriz de ovomucóide.....	27
I.2- Purificação das lectinas.....	28
I.3- Eletroforese.....	29
I.4- Atividade hemaglutinante.....	30
I.5- Determinação da concentração de proteínas.....	30
II- Efeito Inflamatório das lectinas.....	31

	Página
II.1- Amostra.....	31
II.2- Procedimentos experimentais.....	31
II.2.1- Determinação da dose adequada.....	31
II.2.2- Reação inflamatória.....	32
III- Cultura de Fibroblastos.....	33
III.1- Células.....	33
III.2-Lectinas.....	33
III.3- Ensaio de toxicidade.....	34
III.4- Ensaio de proliferação.....	34
III.5- Ensaio de adesão	35
III.6- Revelação - Ensaio colorimétrico.....	35
IV- Influência das lectinas sobre a reparação.....	36
IV.1- Amostra.....	36
IV.2- Procedimentos experimentais.....	37
IV.3- Preparo das lâminas e análise histológica.....	39
RESULTADOS.....	40
I- Purificação das lectinas.....	40
II- Efeito inflamatório.....	45
II.1- Análise macroscópica.....	45
II.2- Análise histológica.....	46
III- Cultura.....	55
IV- Reparação.....	59
IV.1- Retração das feridas.....	60
IV.2- Análise histológica.....	65
IV.2.1- Coloração pela hematoxilina – eosina (HE).....	65
IV.2.2- Coloração argêntea.....	68

	Página
DISCUSSÃO.....	77
I- Purificação.....	77
II- Efeito inflamatório.....	79
III- Cultura.....	82
IV- Reparo.....	89
CONCLUSÕES.....	98
SUMMARY.....	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Medida dos diâmetros das feridas em reparação.....	38
2 Eletroforese em gel de agarose, mostrando o perfil da clara de ovo total (1), do ovomucóide obtido segundo a técnica de LINEWEAVER & MURRAY (2) e do ovomucóide purificado com as modificações (3).....	40
3 Perfil de eluição de PHA.....	41
4 Perfil de eluição da artocarpina.....	42
5 Perfil de eluição da jacalina.....	42
6 Eletroforese em pH ácido e condições não desnaturantes, mostrando o perfil eletroforético do extrato total das sementes de <i>P. vulgaris</i> (1) e os perfis resultantes de duas repetições da purificação de PHA (2 e 3).....	43

7	Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5%, em condições alcalinas, não desnaturantes mostrando o perfil eletroforético da jacalina (1) da artocarpina (2) e do extrato total das sementes de jaca (3).....	44
8	Análise macroscópica da reação inflamatória local provocada pelas lectinas.....	45
9	Reação inflamatória local, induzida após injeção intradérmica das lectinas. Coloração com HE. Controle - 24 horas.....	49
10	Reação inflamatória local, induzida após injeção intradérmica das lectinas. Coloração com HE. PHA – 24 horas.....	49
11	Reação inflamatória local, induzida após injeção intradérmica das lectinas. Coloração com HE. Jacalina- 24 horas.....	49
12	Reação inflamatória local, induzida após injeção intradérmica das lectinas. Coloração com HE. WGA- 24 horas.....	49
13	Reação inflamatória local, induzida após injeção intradérmica das lectinas. Coloração com HE. PHA – 24 horas (16x1,25x10).....	50
14	Reação inflamatória local, induzida após injeção intradérmica das lectinas. Coloração com HE. Jacalina – 24 horas (16x1,25x10).....	50
15	Reação inflamatória local, induzida após injeção intradérmica das lectinas. Coloração com HE. WGA – 24 horas (16x1,25x10).....	50

	Página
16 Reação inflamatória local, induzida após injeção intradérmica das lectinas. Coloração com HE. Controle – 48 horas.....	51
17 Reação inflamatória local, induzida após injeção intradérmica das lectinas. Coloração com HE. PHA – 48 horas.....	51
18 Reação inflamatória local, induzida após injeção intradérmica das lectinas. Coloração com HE. Jacalina – 48 horas.....	51
19 Reação inflamatória local, induzida após injeção intradérmica das lectinas. Coloração com HE. WGA – 48 horas.....	51
20 Reação inflamatória local, induzida após injeção intradérmica das lectinas. Coloração com HE. Controle – 72 horas.....	52
21 Reação inflamatória local, induzida após injeção intradérmica das lectinas. Coloração com HE. PHA – 72 horas.....	52
22 Reação inflamatória local, induzida após injeção intradérmica das lectinas. Coloração com HE. Jacalina – 72 horas.....	52
23 Reação inflamatória local, induzida após injeção intradérmica das lectinas. Coloração com HE. WGA – 72 horas.....	52
24 Reação inflamatória local, induzida após injeção intradérmica das lectinas. Coloração com HE. Controle – 5 dias.....	53

	Página
25 Reação inflamatória local, induzida após injeção intradérmica das lectinas. Coloração com HE. PHA – 5 dias.....	53
26 Reação inflamatória local, induzida após injeção intradérmica das lectinas. Coloração com HE. Jacalina – 5 dias.....	53
27 Reação inflamatória local, induzida após injeção intradérmica das lectinas. Coloração com HE. WGA – 5 dias.....	53
28 Reação inflamatória local, induzida após injeção intradérmica das lectinas. Coloração com HE. PHA – 7 dias.....	54
29 Reação inflamatória local, induzida após injeção intradérmica das lectinas. Coloração com HE. – Jacalina – 7 dias	54
30 Reação inflamatória local, induzida após injeção intradérmica das lectinas. Coloração com HE. WGA – 7 dias.....	54
31 Avaliação da linearidade do ensaio colorimétrico com MTT. Leitura em comprimento de onda de 490nm. Modelo linear ajustado aos seis primeiros pontos experimentais.....	55
32 Avaliação da linearidade do ensaio, após cultivo celular durante cinco dias.....	56
33 Ensaio de toxicidade.....	57

	Página
34 Influência das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina sobre a proliferação de fibroblastos. Símbolos cheios indicam diferença significativa a 5%.....	58
35 Influência das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina sobre a adesão dos fibroblastos.....	59
36 Contração das feridas nas lesões tratadas com PHA.....	60
37 Contração das feridas nas lesões tratadas com WGA.....	61
38 Retração das feridas nas lesões tratadas com a jacalina.....	61
39 Aspecto macroscópico dos ferimentos realizados - Grupo Controle de PHA – 3º dia.....	63
40 Aspecto macroscópico dos ferimentos realizados - Grupo tratado com PHA – 3º dia.....	63
41 Aspecto macroscópico dos ferimentos realizados – Grupo controle de PHA – 7º dia.....	63
42 Aspecto macroscópico dos ferimentos realizados - Grupo tratado com PHA – 7º dia.....	63
43 Aspecto macroscópico dos ferimentos realizados – Grupo controle de PHA – 11º dia.....	63

	Página
44 Aspecto macroscópico dos ferimentos realizados - Grupo tratado com PHA – 11º dia.....	63
45 Aspecto macroscópico dos ferimentos realizados – Grupo controle de PHA – 15º dia.....	64
46 Aspecto macroscópico dos ferimentos realizados - Grupo tratado com PHA – 15º dia.....	64
47 Aspecto macroscópico dos ferimentos realizados – Grupo controle para WGA– 11º dia.....	64
48 Aspecto macroscópico dos ferimentos realizados - Grupo tratado com WGA – 11º dia.....	64
49 Aspecto macroscópico dos ferimentos realizados – Grupo controle para WGA– 15º dia.....	64
50 Aspecto macroscópico dos ferimentos realizados - Grupo tratado com WGA – 15º dia.....	64
51 Reparação tecidual. Coloração com HE. Grupo controle – 3º dia.....	71
52 Reparação tecidual. Coloração com HE. Grupo tratado com WGA – 3º dia (16x1,25x10)......	71
53 Reparação tecidual. Coloração com HE. Grupo controle – 7º dia.....	71

	Página
54 Reparação tecidual. Coloração com HE. Grupo tratado com PHA – 7º dia.....	71
55 Reparação tecidual. Coloração com HE. Grupo tratado com WGA – 7º dia.....	72
56 Reparação tecidual. Coloração com HE. Grupo controle – 11º dia...	72
57 Reparação tecidual. Coloração com HE. Grupo tratado com PHA – 11º dia.....	72
58 Reparação tecidual. Coloração com HE. Grupo tratado com WGA – 11º dia.....	72
59 Reparação tecidual. Coloração com HE. Grupo controle – 15º dia...	73
60 Reparação tecidual. Coloração com HE. Grupo tratado com PHA – 15º dia.....	73
61 Reparação tecidual. Coloração com HE. Grupo tratado com WGA – 15º dia.....	73
62 Reparação tecidual. Coloração argêntea. Grupo controle – 3º dia...	74
63 Reparação tecidual. Coloração argêntea. Grupo controle – 7º dia...	74
64 Reparação tecidual. Coloração argêntea. Grupo tratado com PHA – 7º dia.....	74

	Página
65 Reparação tecidual. Coloração com HE. Grupo tratado com WGA – 7º dia.....	74
66 Reparação tecidual. Coloração argêntea. Grupo controle – 11º dia.	75
67 Reparação tecidual. Coloração argêntea. Grupo tratado com PHA – 11º dia	75
68 Reparação tecidual. Coloração argêntea. Grupo tratado com a jacalina – 11º dia.....	75
69 Reparação tecidual. Coloração argêntea. Grupo tratado com WGA – 11º dia.....	75
70 Reparação tecidual. Coloração argêntea. Grupo controle – 15º dia.	76
71 Reparação tecidual. Coloração argêntea. Grupo tratado com PHA – 15º dia	76
72 Reparação tecidual. Coloração argêntea. Grupo tratado com WGA – 15º dia.....	76

RESUMO

A reparação é caracterizada por diversos eventos celulares e humorais que ocorrem de forma integrada. As lectinas são glicoproteínas com diversas atividades biológicas, tais como a ativação de células inflamatórias e a secreção de citocinas que ativam fibroblastos, as quais podem influenciar o reparo.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência das lectinas PHA, WGA e jacalina na reparação tecidual. As respostas inflamatórias *in vivo* e a influência das lectinas sobre a proliferação de fibroblastos *in vitro*, também foram avaliadas.

Para avaliar a reparação, 300 µg/mL de cada lectina foram aplicados sobre as feridas provocadas no dorso de ratos Wistar, com *punch* de biópsia de 8 milímetros. A retração das feridas foi medida diariamente, após a aplicação. Nos dias 3, 7, 11 e 15 foram realizadas as análises histológicas, em cortes corados com hematoxilina - eosina e impregnados pela prata. Os efeitos inflamatórios foram avaliados após injeção intradérmica das lectinas. A proliferação de fibroblastos, na presença das lectinas, foi avaliada por técnica colorimétrica.

PHA acelerou a reparação. Aumentou o depósito e a maturação das fibras de colágeno e antecipou a reepitelização. As análises histológicas revelaram reação inflamatória, com predominância de células mononucleares. Quando adicionado ao meio de cultura, PHA inibiu a proliferação dos fibroblastos nas concentrações acima de 20 µg/mL. WGA retardou a reparação, o que foi evidenciado pelo atraso no desenvolvimento do tecido de granulação e na formação do epitélio. Induziu fraca reação inflamatória no local de aplicação e, acima de 20 µg/mL, inibiu a

proliferação dos fibroblastos. A jacalina não influenciou o reparo tecidual ou a proliferação dos fibroblastos. Entretanto, induziu reação inflamatória local com predominância de células mononucleares.

Possivelmente, a agregação de células inflamatórias pela ação de PHA foi benéfica. Linfócitos e macrófagos ativados secretam citocinas e fatores de crescimento importantes na reparação. Ao interagir com os receptores para a fibronectina e outras proteínas, WGA impediria a interação das células com a matriz, retardando a reparação. Apesar da jacalina exercer ação mitogênica sobre os linfócitos T, estimular a secreção de $\text{INF}\gamma$ e produzir reação inflamatória local, esta lectina não influenciou a reparação.

Palavras-chave: PHA, WGA, jacalina, lectinas, reparação, inflamação, fibroblastos.

INTRODUÇÃO

A reparação é um processo complexo. Envolve o recrutamento de células do tecido conjuntivo ao sítio de reparo, a proliferação celular e a síntese de componentes da matriz extracelular. O processo é coordenado por mediadores oriundos das células que participam da coagulação sanguínea e de células inflamatórias.

Após a lesão, diversos eventos são ativados contribuindo para o restabelecimento da função do tecido ou do órgão lesado. As células fagocitárias mononucleares atuam na eliminação dos produtos de necrose e na síntese e secreção de mediadores solúveis, eventos centrais no processo de reparação (WAHL et al., 1989). Estes mediadores promovem o recrutamento, a proliferação e a ativação de fibroblastos e de células endoteliais. Os fibroblastos ativados aumentam a síntese e a secreção de proteínas constituintes da matriz extracelular. IL-1, $TNF\alpha$ e $TGF\beta$ regulam a síntese de colágeno, das proteoglicanas e das glicoproteínas (WAHL et al., 1989).

As células inflamatórias são fundamentais no processo de reparo. Os macrófagos, atraídos ao local por fatores quimiotáticos, são ativados, proliferam e diferenciam-se. Os linfócitos ativados secretam linfocinas que ativam outros linfócitos e os macrófagos. KOVACS et al. (1993) demonstraram que leucócitos periféricos, estimulados com IL-2, são capazes de induzir a proliferação de fibroblastos e a produção de tecido conjuntivo. A expressão dos genes que

para TGF β também foi aumentada. DUNCAN & BERMAN (1985) demonstraram que o INF tem função reguladora na reparação. DOHMAN et al. (1985) caracterizaram, no sobrenadante da cultura de leucócitos estimulados com PHA, proteínas e peptídeos com funções ativadoras de fibroblastos.

As lectinas são glicoproteínas de origem não imune que se ligam à açúcares. Estão amplamente distribuídas na natureza, sendo freqüentemente encontradas na superfície celular ou em partículas intracelulares (SHARON & LIS, 1989; MODY et al., 1995).

O interesse pelas lectinas na investigação científica, se deve às diversas atividades biológicas a elas atribuídas. Por possuírem sítios específicos de ligação a carboidratos, são capazes de interagir com as moléculas dos fluidos biológicos e com os receptores de superfície celular (BEUTH et al., 1995). Estas moléculas podem substituir os ligantes naturais e ativar as células através dos diferentes caminhos de sinalização intracelular ou através da internalização do complexo formado (PORETZ et al., 1980).

Dentre as múltiplas atividades atribuídas a estas moléculas, muitas poderiam contribuir ou promover a reparação. A estimulação mitogênica de linfócitos, a indução da reação inflamatória no local de aplicação, a quimioatração de leucócitos e a estimulação da produção e secreção de citocinas, como ILs, INF γ , TNF α e TGF β , potencialmente contribuem para este processo.

As lectinas PHA, a fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris*, e a jacalina, uma das lectinas das sementes de *Artocarpus integrifolia*, possuem a habilidade de modificarem ou influenciarem em diversas destas atividades biológicas. Dentre as habilidades atribuídas a estas lectinas, a atividade mitogênica sobre linfócitos (NOWELL, 1960; KANELLOPOULOS et al., 1985; PINEAU et al., 1990), a estimulação da produção de citocinas pelos leucócitos ativados (CRANE et al., 1984; DALMAU et al., 1989; VAN WAUNE et al., 1995) e a atração de células mononucleares ao local de aplicação (SAKAMOTO et al., 1995a; FELIPE et al., 1995; MODY et al., 1995) podem contribuir em diversas etapas da reparação.

A aglutinina de germe de trigo, WGA, não possui atividade mitogênica sobre os linfócitos. Ao contrário, exerce efeito inibitório sobre o metabolismo dos linfócitos (GREENE & WALCHMANN, 1980). Assim, possivelmente, esta molécula não exerce a mesma influência que PHA e a jacalina no processo de reparo.

Em função das habilidades biológicas destas lectinas, é provável que elas influenciem a reparação de feridas, agindo de forma a ativar ou inibir alguns dos passos deste processo complexo. Entretanto, a literatura não registra estudos que avaliem a influência das lectinas sobre a reparação tecidual.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência das lectinas PHA, de *Phaseolus vulgaris*, WGA, a aglutinina de germe de trigo, e a jacalina de *Artocarpus integrifolia*, no processo de reparação tecidual de pele de ratos.

REVISÃO DE LITERATURA

I - REPARO

A reparação é um processo homeostático, dinâmico e complexo, caracterizado por diversos eventos seqüenciais (LAWMAN et al., 1985) e pela ação integrada de diferentes células (XIAOBING et al., 1996). Em uma abordagem geral, envolve as fases de inflamação, proliferação celular, angiogênese e síntese de componentes da matriz do tecido conjuntivo, como proteoglicanas e colágeno, seguida pela remodelação e maturação do colágeno (FRANCK, 1995; XIAOBING et al., 1996). Pode ocorrer por regeneração, quando o tecido lesado é substituído por células parenquimatosas do mesmo tipo, ou pela cicatrização, quando há substituição por tecido conjuntivo (COTRAN et al., 1994; TROWBRIDGE & EMLING, 1996).

A fase inflamatória é responsável pela remoção de fragmentos de células e tecidos. Caracteriza-se pela infiltração de leucócitos polimorfonucleares seguida pelo influxo de células mononucleares, monócitos e linfócitos, as quais estão associadas à regulação dos fibroblastos, tanto na proliferação quanto na ativação e à síntese de matriz extracelular (WAHL & GATELY, 1983; LAWMAN et al., 1985; TURCK et al., 1987).

Na migração dos leucócitos para os tecidos a adesão das células ao endotélio representa a primeira etapa no processo (DiCORLETO & DE LA MOTTE, 1989). A

atividade quimiotática para leucócitos é exercida por diversos fatores. O PDGF, fator de crescimento derivado de plaquetas, é quimiotático para leucócitos polimorfonucleares e monócitos (TURCK et al., 1987), assim como NGF, fator de crescimento neural (TURCK et al., 1987; LAWMAN et al., 1985). A IL-1, Interleucina-1, também estimula a migração de monócitos além dos linfócitos (COTRAN et al., 1994). O $\text{TNF}\alpha$, fator de necrose tumoral - alfa, tem ação quimiotática para neutrófilos, macrófagos e células endoteliais (XIAOBING et al., 1996). O $\text{TGF}\beta$ fator de crescimento transformador - beta, tem ação quimiotática apenas para monócitos (TURCK et al., 1987).

Além das substâncias que possuem atividade quimiotática, outros fatores autócrinos e/ou parácrinos participam dos diversos eventos da reparação. Estão incluídas as citocinas PDGF, TGF, TNF, EGF (fator de crescimento epidérmico), FGFs (fatores de crescimento de fibroblastos), e IL (interleucinas). A IL-1, sintetizada e secretada por monócitos, macrófagos, queratinócitos, células de Langerhans, dentre outras células, estimula a proliferação e ativação de fibroblastos. $\text{TNF}-\alpha$ é mitogênico para os fibroblastos em cultura (XIAOBING et al., 1996). O PDGF é quimiotático para fibroblastos, estimula a sua proliferação e a síntese de colágeno (TURCK et al., 1987) e EGF é mitogênico para as células epiteliais e fibroblastos (COTRAN et al., 1994).

A síntese de colágeno e de outros componentes da matriz extracelular, como elastina e proteoglicanas, é estimulada por diversos fatores de crescimento (PDGF, FGF, $\text{TGF}-\beta$) e citocinas (IL-1, IL-4), os quais são secretados por leucócitos e fibroblastos (TURCK et al., 1987; COTRAN et al., 1994; HÄKKINEN et al., 1996). A angiogênese é também ativada por diversos destes fatores solúveis: FGF, $\text{TNF}\alpha$, $\text{TGF}-\alpha$, $\text{TGF}-\beta$, PDGF-BB e VEGF (fatores de crescimento de endotélio vascular) (TURCK et al., 1987; BROOKS, et al., 1994; COTRAN et al., 1994; FRANK et al., 1995).

Polipeptídeos de baixo peso molecular, na faixa de 500 – 40.000 daltons, denominados genericamente de fatores ativadores de fibroblastos (FAF), podem ser encontrados nos sobrenadantes de cultura de linfócitos e monócitos ativados e também contribuem para a reparação (WAHL & GATELY, 1983; TURCK et al., 1987; DiCORLETO & DE LA MOTTE, 1989). Ao contrário das linfocinas e monocinas, estas moléculas possuem atividade preferencial a um tipo de célula (TURCK et al., 1987). DOHLMAN et al. (1985) observaram que monócitos humanos purificados, assim como as células da linhagem U937, geram peptídeos e proteínas com atividade de FAF quando ativadas com fitohemaglutinina (PHA).

A reestruturação do tecido é regulada por células mononucleares, as quais podem modular várias funções dos fibroblastos, tais como a síntese de colágeno, a proliferação e a migração celular. Esta modulação é importante nas diversas etapas do processo de reparação, tanto na fase inicial como na final (NEILSON et al., 1982; LEMAIRE & DUBOIS, 1983; WAHL & GATELY, 1983; DUNCAN & BERMAN, 1985).

A regulação é mediada por fatores solúveis de baixa massa molecular, linfocinas e monocinas, que agem estimulando ou inibindo as funções dos fibroblastos. A análise cromatográfica do sobrenadante de cultura de linfócitos ativados, realizada por NEILSON et al. (1982), indica a presença de duas frações, uma com massas moleculares de 10-15 kDa e outra de 50 kDa. Estas duas frações possuem efeitos antagônicos sobre a proliferação de fibroblastos, uma vez que a primeira ativa e a segunda inibe a proliferação de fibroblastos *in vitro*. Um mediador de 40 kDa, gerado por linfócitos estimulados por Con A, induz a proliferação de fibroblastos quiescentes de diferentes espécies, como medido pela incorporação de timidina tritiada (WAHL & GATELY, 1983). ANASTASSIADES & WOOD (1981) e LEMAIRE & DUBOIS (1983) purificaram fatores solúveis de leucócitos mononucleares, estimulados por Con A ou PHA, que reduzem a síntese de DNA e a proliferação de fibroblastos. DUNCAN & BERMAN (1985) caracterizaram as monocinas (INF β) e linfocinas (INF γ) como mediadores solúveis do processo de

regulação. Segundo esses autores, estas citocinas agem como inibidoras da proliferação de fibroblastos e da produção de colágeno na fase tardia do processo de reparo, mas não na sua fase inicial. BRESLIN et al. (1988b) demonstraram que ferimentos com 10 dias de reparação apresentam citocinas supressoras da estimulação de linfócitos, secretadas pelos linfócitos T supressores. Estas linfocinas suprimem a blastogênese dos linfócitos estimulados por PHA. A ação destas citocinas é específica aos linfócitos, não influenciando na proliferação dos fibroblastos. KOVACS et al. (1993) demonstraram que leucócitos periféricos tratados com IL-2, *in vitro*, são capazes de induzir a proliferação de fibroblastos e a produção de tecido conjuntivo, assim como a expressão de genes que codificam para TGF β e PDGF-BB.

Vários estudos têm sido realizados sobre o processo de reparação de pele de ratos, após incisões ou excisões, obtidas experimentalmente, e com aplicações de diferentes substâncias. Estes experimentos visam avaliar os mecanismos e mediadores envolvidos no processo (BRESLIN et al., 1988a; BRESLIN et al., 1988b; KAVOKS et al., 1993; FRANCK et al., 1995; XIAOBING et al., 1996; VAN DE WATER, 1997), assim como os processos ou substâncias que poderiam retardar (REED et al., 1985; KUBOTA et al., 1985) ou acelerar a reparação (LAWMAN et al., 1985; SOUBHIA et al., 1992; XIAOBING et al., 1996). Além disso, em experimentos que visam avaliar apenas os eventos iniciais do processo, injeções de drogas por via subcutânea ou em sacos de ar dorsal (LAWMAN et al., 1985) podem também ser realizados.

As avaliações são realizadas durante um período compreendido entre o primeiro e o vigésimo oitavo dia. Análises em apenas um ou poucos dias (KUBOTA et al., 1985; BRESLIN et al., 1988b) são menos comuns que em dias alternados (UZUNIAN, 1979; BROWN et al., 1992; FRANCK et al., 1995; XIAOBING et al., 1996; ALMEIDA, 1997; VAN DE WATER, 1997).

A metodologia de análise compreende estudos histológicos em cortes corados pela hematoxilina - eosina (UZUNIAN, 1979; KUBOTA et al., 1985; LAWMAN et

al., 1985; SPOLIDORIO, 1991; SOUBHIA et al., 1992; XIAOBING et al., 1996; ALMEIDA, 1997; VAN DE WATER, 1997), pela impregnação pela prata e pela reação histoquímica de metacromasia com azul de o-toluidina pH 4,0 (SPOLIDORIO, 1991; ALMEIDA, 1997). As análises também podem ser realizadas pela histometria (UZUNIAN, 1979, GOLDMAN, 1983), através da medida da retração das feridas (KUBOTA et al., 1985; BROWN et al., 1992), da determinação do conteúdo de hidroxiprolina (KUBOTA et al., 1985), e da força de ruptura das feridas (XIAOBING et al., 1996). Medidas da expressão do mRNA, para procolágeno, fibronectina (KOVACS et al., 1993) e fatores de crescimento, como VEGF (FRANCK et al., 1995), ou do acúmulo de RNA ou DNA no tecido em reparação (XIAOBING et al., 1996), também são realizados.

De forma geral observa-se que depois dos primeiros minutos seguintes à injúria, o fluxo hemorrágico é paralisado pelos fatores de coagulação (HENKE et al., 1996; VAN DE WATER, 1997). Durante os próximos três dias aparecem as células inflamatórias, primeiramente neutrófilos e, depois do segundo dia, os monócitos. Simultaneamente, ocorre a migração das células da epiderme, visando a reepitelização. Próximo ao quarto dia, o tecido de granulação, rico em novos vasos sangüíneos, é observado (VAN DE WATER, 1997). Este tecido de granulação é infiltrado por fibroblastos, os quais surgem das células da derme circundante em resposta a agentes quimiotáxicos. Por volta do sétimo dia, uma nova epiderme cobre a ferida e o tecido de granulação, rico em fibras e vasos sangüíneos, exibe uma orientação paralela ao plano da epiderme (HENKE et al., 1996). Os fibroblastos, presentes no ferimento, proliferam, são ativados e têm a importante função de produzir procolágeno tipo I, fibras e matriz extracelular (TURCK et al., 1987; COTRAN et al., 1994; CLARCK, 1996). A síntese de fibras colágenas inicia-se ao redor do quarto dia e atinge o máximo de desenvolvimento entre quinze a vinte dias, decaindo progressivamente. Paralelamente, tem início a síntese de substância fundamental amorfa, composta principalmente por glicosaminoglicanas. Esta

substância é indispensável ao processo de agregação de fibrilas, formando feixes e fibras de colágeno. Sua síntese é grande até o décimo quinto dia.

As proteínas plasmáticas, como fibrina, fibrinogênio e fibronectina, são importantes na fase inicial da cicatrização e formação do tecido de granulação. As interações entre as células e a matriz extracelular influenciam na migração, proliferação e diferenciação celulares. O tipo de colágeno na matriz, a presença de fibronectina, laminina e a natureza das proteoglicanas nas áreas pericelulares parecem afetar esses processos (VAN DE WATER, 1997).

A angiogênese é caracterizada pela invasão, migração e proliferação de células endoteliais dos vasos adjacentes, sendo fundamental a presença de moléculas de adesão. Os receptores expressos na superfície das células endoteliais, durante a reparação das feridas, denominados de integrinas $\alpha_v\beta_3$, ligam-se aos componentes da matriz extracelular e ativam os mecanismos de sinalização intracelular cálcio dependente, necessários a migração (BROOKS et al., 1994; HENKE et al., 1996).

Para a retração das feridas, os miofibroblastos emitem pseudópodes sobre os componentes da matriz extracelular, ligando-se às moléculas de fibronectina e colágeno, e retraíndo posteriormente. Quando todo o processo é completado, os fibroblastos desaparecem por apoptose (CLARCK, 1993).

A ação integrada, concomitante e/ou subsequente de todos esses processos, assim como a maturação dos componentes envolvidos, culminam com a formação de tecido conjuntivo fibroso, o qual é conhecido como cicatriz.

II - LECTINAS

As lectinas representam uma classe de (glico)proteínas de origem não imune que se ligam, específica e reversivelmente, a açúcares. Estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em plantas, animais vertebrados, invertebrados e microorganismos (LIS & SHARON, 1986; MODY et al., 1995;

KENNEDY et al., 1995), sendo freqüentemente encontradas na superfície celular ou em partículas intracelulares (SHARON & LIS, 1989).

Por possuírem sítios específicos de ligação a carboidratos, são capazes de interagir com diversas moléculas dos fluidos biológicos e receptores de superfície celular, agindo como decodificadores das informações trocadas entre moléculas, células e organismos (MISQUITH et al., 1994). Algumas lectinas se ligam a moléculas comuns às diferentes células, enquanto outras se ligam-se a receptores específicos de uma determinada população celular. As lectinas podem substituir os ligantes naturais e ativar as células através dos diferentes caminhos de sinalização celular, mimetizando a ação destes (KAPLOWITZ, 1985; SANTOS-DE-OLIVEIRA et al., 1994; GERVASI et al., 1996).

As lectinas foram descritas no final do século passado como proteínas de plantas capazes de aglutinar eritrócitos. Apesar do conhecimento sobre as lectinas existir a mais de cem anos, muitas de suas atividades biológicas, incluindo a possibilidade de agirem como moléculas de reconhecimento celular, são de conhecimento recente (SHARON & LIS, 1989).

Dentre as diversas atividades biológicas atribuídas às lectinas, destacam-se a identificação de grupos sanguíneos, a caracterização de microorganismos, a estimulação mitogênica de células imunes e a detecção e o isolamento de carboidratos em solução, nas macromoléculas ou em superfície celular (BEUTH et al., 1995). Também estão envolvidas nos processos de reconhecimento e das interações celulares. Estas atividades são essenciais na proliferação, diferenciação, inibição por contato e morte celular, assim como na formação de órgãos, migração celular, defesa imunológica, metástases, iniciação de infecções e simbiose (LIS & SHARON, 1986; SHARON & LIS, 1989; HOLMSKOV et al., 1994; BEUTH et al., 1995 e MODY et al., 1995).

Estas funções estão relacionadas à diversidade estrutural das lectinas e dos carboidratos presentes em células opostas, as quais podem ser do mesmo tipo ou não. Além disso, lectinas ou carboidratos solúveis podem agir como pontes ligando-

se a células opostas e à matriz extracelular (SHARON & LIS, 1989; MODY et al., 1995).

As lectinas foram classificadas como mitogênicas ou não mitogênicas conforme a capacidade de aumentarem a síntese de DNA e de induzir a transformação blástica de populações específicas de linfócitos. A ativação mitogênica de linfócitos é policlonal e induz alterações morfológicas, modulação fenotípica dos determinantes de superfície e secreção de linfocinas ou imunoglobulinas (WHISLER & YATES, 1980).

Na década de sessenta foi descoberta a atividade mitogênica da lectina de *Phaseolus vulgaris*, PHA (NOWELL, 1960). Em seguida, foi demonstrado que concanavalina A, Con A, apresentava atividade mitogênica sobre linfócitos (REICHERT et al., 1973) e posteriormente foi demonstrado que ambas são mitógenos seletivos para as células T e que se ligam aos receptores TCR dos linfócitos (KANELLOPOULOS et al., 1985). Outro excelente mitógeno, para as células T humanas e esplênicas murina, é a lectina artocarpina isolada da semente de *A. integrifolia* (MIRANDA-SANTOS et al., 1991b). A jacalina é mitogênica para linfócitos T CD4, porém a estimulação ocorre apenas na presença de células mononucleares (PINEAU et al., 1990). Em contraste, a aglutinina extraída do germe do trigo, WGA, induz sinal negativo sobre a ativação dos linfócitos, o que resulta na inibição da proliferação destas células (GREENE & WALCHMANN, 1980). A estimulação policlonal de linfócitos B, somente ocorre em condições específicas (GREENE et al., 1981).

A estimulação de leucócitos na presença das lectinas pode resultar na produção de diversas citocinas. FERRANTE et al. (1990) estudaram a produção de $\text{INF}\gamma$, por leucócitos estimulados por Con A, e a ativação de células fagocitárias, incluindo macrófagos. A estimulação de células do baço com lectinas é utilizada como fonte de IL-2 (DALMAU et al., 1989). Células de sangue humano cultivadas na presença de PHA secretam diversas citocinas, como IL-2, IL-5, GM-CSF e $\text{INF}\gamma$, importantes no processo inflamatório crônico (VAN WAUNE et al., 1995). A

jacalina também induz a produção de INF γ pelos linfócitos humanos, em cultura de hibridoma de células T (CRANE et al., 1984), e de fatores de crescimento de células T pelas células esplênicas de ratos (DALMAU et al., 1989), semelhante ao que se obtém com Con A. Estudos mais recentes *in vitro* mostram que a jacalina induz a síntese de TGF β , IL-3/GM-CS e IL-6 em células esplênicas murinas.

A função das lectinas endógenas na interação célula - célula e célula - matriz é fundamental na proliferação, diferenciação e migração celular (STULNIG et al., 1993). O processo é mediado pelas interações entre as glicoproteínas de superfície celular, as moléculas de adesão e seus receptores.

A adesão das células ao endotélio representa a primeira etapa no processo de migração dos leucócitos para os tecidos (DiCORLETO & DE LA MOTTE, 1989). As moléculas de adesão foram agrupadas através da homologia estrutural e compreendem um conjunto de três famílias. Foram classificadas como selectinas, integrinas e a superfamília das imunoglobulinas (CRONSTEIN & WEISSMAN, 1993).

Na família das selectinas, destacam-se as L, as P e as E-selectinas. As L-selectinas são expressas em todos os leucócitos e células provenientes da medula óssea, mas desaparecem dos leucócitos assim que se inicia a adesão firme destes ao endotélio. As P-selectinas (GMP-140) se expressam em células endoteliais, minutos após a ativação, e nas plaquetas, após estímulo trombótico. Sua expressão não é induzida pelas citocinas. As E-selectinas (ELAM-1) são expressas somente pelas células endoteliais, horas após a ativação, desaparecendo dentro de um período de vinte e quatro horas. Esta selectina determina a adesão de monócitos e linfócitos ao endotélio (TEDDER et al., 1995; SYMON & WARDLAW, 1996). P e L selectinas podem mediar a transmissão de sinais e ativar funções celulares (MODY et al., 1995). Geralmente as selectinas se ligam a carboidratos contendo ácido siálico, como o grupo sialil Lewis^x (sLex) (SYMON & WARDLAW, 1996).

As selectinas são responsáveis pela primeira etapa de adesão, porém esta é de baixa afinidade. Um contato de maior afinidade com as células endoteliais é

realizado pelas integrinas leucocitárias CD11/CD18, completando o processo de adesão (TEDDER et al., 1995). As integrinas são glicoproteínas heterodiméricas constituídas por duas cadeias α e β , associadas. Participam da interação do neutrófilo ao endotélio ou à fibronectina. A β_2 é exclusiva de leucócitos. Na subfamília β_1 está incluída a VLA-4 (Very Late Antigen-4), importante na interação de monócitos e linfócitos ao endotélio. Estas subfamílias também estão envolvidas nas interações com as moléculas da superfamília das imunoglobulinas (SMITH et al., 1988).

Constituindo a superfamília das imunoglobulinas, têm-se as ICAMs (moléculas de adesão intercelular), as VCAMs (moléculas de adesão a células vasculares) e as PECAMs (moléculas de adesão célula endotelial- plaquetas) sendo que ICAM-1 e 2 e VCAM-1 são expressas no endotélio e em outros tipos celulares como fibroblastos. ICAM-3 é encontrada principalmente nos linfócitos T, monócitos e neutrófilos. Sua expressão pode ser aumentada por mitógenos. ICAM-1 pode ser induzida por $\text{INF-}\gamma$, TNF e LPS, assim como VCAM-1, porém sua expressão é menor. A expressão de ICAM-2 não é aumentada por linfocinas (McEVER, 1992).

Considerando que a migração de neutrófilos é decorrente da interação destes com as células endoteliais, envolvendo as selectina, ASSREUY et al. (1996) avaliaram o efeito inibitório de algumas lectinas vegetais, específicas para manose e glicose, sobre a migração *in vivo*. Observaram que apenas algumas delas apresentavam o efeito inibitório, sugerindo que a participação de receptores específicos não é a única característica responsável pelo feito biológico.

A jacalina tem atividade quimiotática sobre neutrófilos após a sua administração intraperitoneal em camundongos Balb/c e CBA mas não sobre camundongos suíços, C57B16 ou ratos (SAKAMOTO et al., 1995a). A artocarpina induz a migração de neutrófilos na cavidade peritoneal e *air pouch* em ratos e possui atividade quimiotática para neutrófilos *in vitro* (SANTOS-DE-OLIVEIRA et al., 1994). Atividade quimiotática para células mononucleares foi descrita para PHA (MODY et al., 1995). Com A aumenta o número de células mononucleares, após

injeção intraperitoneal (FELIPE et al., 1995). A lectinas de soja tem ação quimiotática sobre neutrófilos e ativam macrófagos (BENJAMIN et al., 1997).

A participação das glicocadeias de membrana, na interação com outras células ou com a matriz extracelular, contribuindo para a proliferação, diferenciação e homeostasia, é uma característica de vários processos biológicos. Em musgos, o processo de desenvolvimento é regulado através da interação entre as lectinas e os oligossacarídeos presentes na superfície de células opostas. As lectinas são específicas aos resíduos de galactose / N-acetilgalactosamina.

Conforme evidenciado por WIESER & OESCH (1988) a presença de resíduos de D-galactose, β -glicosidicamente ligados, é essencial para o controle do crescimento de fibroblastos *in vitro*. A presença de lectinas específicas para estes resíduos promove um grande aumento da razão de proliferação celular e densidade de saturação. A glicoproteína de membrana responsável pela inibição por contato foi posteriormente caracterizada e denominada *contactinhibin*. Ao mesmo tempo, foi observado que esta proteína é desializada, expondo os resíduos de galactose inativos em células esparsas, durante o controle de crescimento celular (WIESER et al., 1995).

ASAGA & YOSHIZATO (1992) estudaram o efeito de glicocadeias na interação dos fibroblastos com as fibras de colágeno. Usando diversas lectinas como ferramenta, observaram que estas glicoproteínas interagem principalmente com a PHA-E₄. Outras lectinas como Con A e WGA, também reconhecem glicocadeias específicas que envolvem a ligação ao colágeno, embora também reconheçam outras moléculas. Possivelmente WGA inibe a função do receptor de fibronectina celular.

Dentre as múltiplas atividades atribuídas às lectinas, muitas poderiam contribuir ou promover a reparação. A estimulação mitogênica de linfócitos, a indução da reação inflamatória no local de aplicação, a quimiotaxia de leucócitos e a estimulação da produção e secreção de citocinas, como ILs, INF γ , TNF α e TGF β , potencialmente contribuem para este processo.

As lectinas PHA e a jacalina possuem a habilidade de modificarem ou influenciarem diversas atividades biológicas. Dentre as habilidades atribuídas a estas lectinas, a atividade mitogênica sobre linfócitos, a estimulação da produção de citocinas endógenas pelas células mononucleares e a atração de leucócitos ao local de aplicação, podem contribuir em diversas etapas da reparação. A aglutinina de germe de trigo, WGA, ao contrário não possui atividade mitogênica sobre os linfócitos, exercendo efeito inibitório sobre o metabolismo dos linfócitos. Assim, possivelmente não exerce a mesma influência que PHA e a jacalina no processo de reparação.

II.1 - Fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA)

A lectina presente em *Phaseolus vulgaris*, fitohemaglutinina (PHA), possui potente atividade aglutinadora sobre eritrócitos e mitogênica para linfócitos. Estas atividades são decorrentes de uma mistura de proteínas com atividades biológicas diferentes denominadas isolectinas.

As isolectinas foram caracterizadas por LEAVITT et al., em 1977, através da separação em cromatografia de troca iônica e, mais tarde, por FLEISHMANN et al. (1985) em cromatografia de afinidade. Esta última técnica permitiu a purificação em etapa única.

As isolectinas apresentam propriedades físicas e químicas semelhantes. Estas moléculas possuem composição semelhante de aminoácidos e formam, em SDS-PAGE, uma única banda de 33 kDa e por ultracentrifugação demonstram ter massa molecular de 115 kDa. Possuem, portanto, estrutura tetramérica. De acordo com suas atividades biológicas foram classificadas como L₄, L₃E₁, L₂E₂, L₁E₃ e E₄, onde E e L representam as subunidades reativas com eritrócitos ou linfócitos e o subscrito representa a composição da subunidade. A maior afinidade aos eritrócitos humanos aumenta com o número de subunidades E no tetrâmero. A L₄ não liga

significativamente aos eritrócitos, apesar de ligar com alta afinidade aos linfócitos e agir como mitógeno.

Segundo CUMMINGS & KORNFIELD (1982) as isolectinas possuem especificidades diferentes aos carboidratos. Na presença de resíduos de galactose, E e L-PHA interagem com os oligossacarídeos ligados à asparagina. As diferenças de afinidade estão relacionadas à forma de ligação dos resíduos de N-acetilglicosamina e manose aos resíduos de galactose. E-PHA interage com maior afinidade quando os glicopeptídeos contém dois resíduos externos de galactose e um de N-acetilglicosamina ligados (β -1,4) a resíduos de manose. L-PHA, por outro lado, interage melhor quando os resíduos de manose estão ligados nas posições C-2 e C-4 ou C-2 e C-6 aos resíduos de N-acetilglicosamina.

GLAD & BORREBAECK (1984) atribuíram as diferenças nas atividades biológicas das isolectinas, a maior ou menor afinidade entre as frações E ou L com as glicoproteínas séricas. Desta forma, a subunidade L apresenta baixa afinidade com as proteínas séricas, ficando livre para ativar os linfócitos.

KANELLOPOULOS et al. (1985) descreveram que a molécula de PHA liga-se à superfície dos linfócitos através da interação com os carboidratos presentes nos receptores para antígenos de células T (Ti). O receptor de ligação de PHA é diferente de Con A, o qual se liga à T3. PEUMANS & DAMME (1993) e BARDOCZ et al. (1993) citam a atividade estimuladora de crescimento que esta lectina exerce sobre as células intestinais de ratos *in vivo*, após serem endocitadas.

A análise comparativa de sessenta e dois cultivares de *P. vulgaris* foi feita por FELSTED et al. (1981), os quais observaram considerável homologia em suas atividades biológicas e estruturais. DERBYSHIRE et al. (1988) demonstraram que PHA purificada da variedade Goiano precoce possui perfil eletroforético semelhante ao do mitógeno comercial. A lectina purificada apresentou atividade estimulatória de linfócitos cerca de 12 a 15 vezes maior. Em 1995, GONÇALVES & COSTA isolaram as isolectinas desta variedade.

Células presentes no sangue humano total, cultivadas na presença de PHA, secretam diversas citocinas (VAN WAUNE et al., 1995). Dentre elas as citocinas IL-2, IL-5, GM-CSF e INF γ , apresentam funções importantes no processo inflamatório crônico. Interleucina-2 é a principal citocina necessária ao desenvolvimento de células T durante a resposta imune. IL-5 estimula o crescimento, a diferenciação e a atividade de eosinófilos. GM-CSF induz a hematopoiese e a ativação de monócitos, eosinófilos e neutrófilos, enquanto que INF γ estimula a função de monócitos e macrófagos.

MODY et al. (1995) citam que L-PHA pode exercer diversos efeitos terapêuticos em função de suas atividades biológicas. Incluem, entre diversas outras atividades, a habilidade de L-PHA em estimular a linfopoiese, atrair células mononucleares ao sítio de injeção, agir como imunoestimulante, ativando a proliferação e ativação das células efectoras, estimular a produção de citocinas endógenas e agir como adjuvante.

II.2 - Lectina de germe de trigo (WGA)

A aglutinina de germe de trigo (WGA) foi caracterizada em 1974, por NAGATA & BURGER, como uma molécula de massa molecular igual a 17 kDa e coeficiente de sedimentação 2,1 S, em solução ácida, porém como um dímero de 35 kDa, em pH neutro. WGA possui afinidade a N-acetil-glucosamina, existindo dois sítios de ligação por molécula, mas também possui alta afinidade a di e trisacarídeos β -1,4 ligados. Além destes, possui afinidade aos resíduos de ácido siálico (KEARSE & SINGER, 1994).

Embora seja capaz de aglutinar várias células, incluindo as células linfóides (GREENE et al., 1981), foi caracterizada como uma lectina não mitogênica para as células linfóides humanas ou de roedores (SHUMANN et al., 1973).

GREENE et al. (1981) demonstraram que WGA, em condições apropriadas como baixas doses e na presença de células mononucleares, estimulam *in vitro* a

síntese e a secreção de imunoglobulinas por linfócitos B. A estimulação tem natureza poli-isotípica, pois aumenta a síntese e secreção das imunoglobulinas das classes IgG, IgM e IgA. Provavelmente a ativação é policlonal, mas certamente é dependente das célula T. Envolve a interação de WGA com glicoproteínas e glicolipídeos da membrana celular. Estes mesmos autores observaram que, em baixas doses, estimulam a síntese de DNA em linfócitos totais ou subpopulação de células T. Em contraste a este mecanismo estimulatório, em doses maiores, acima de 15 $\mu\text{g/mL}$, WGA induz a supressão da síntese de DNA de linfócitos estimulados por outras lectinas ou antígenos. Assim, esta lectina poderia ter efeitos opostos atuando como mitógeno e anti-mitógeno para linfócitos humanos.

ITO et al. (1984) estudaram vinte e duas lectinas em relação a sua habilidade de produzirem INF, em cultura de células esplênicas de camundongos. Observaram que entre as lectinas com especificidade para os resíduos de D-manose, D-glucose ou N-acetil-D-glucosamina, algumas com maior atividade mitogênica como Con A induzem a produção de $\text{INF}\gamma$, enquanto que WGA induz a síntese de $\text{INF}\beta$. WGA também induz a produção de INF na circulação após injeção intraperitoneal, em camundongos.

Efeitos sobre a modulação da resposta de defesa do organismo têm sido atribuídos a esta lectina. MODY et al. (1995) citam a capacidade de WGA em estimular a liberação de superóxido pelos neutrófilos.

II.3 - Jacalina e Artocarpina

Entre as lectinas de plantas usadas como ferramenta experimental, as lectinas extraídas de *Artocarpus integrifolia* têm atraído vários pesquisadores, por apresentarem propriedades bioquímicas e imunológicas interessantes. Compreendem a jacalina (JAC), lectina específica aos resíduos de D-galactose, e a artocarpina (ART) com especificidade para a D-manose.

A jacalina foi inicialmente purificada e caracterizada por dois grupos independentes (MOREIRA & AINOZ, 1981 e SURESHKUMAR et al., 1982). Esta lectina é capaz de aglutinar eritrócitos humanos, sem discriminação entre os diferentes grupos sanguíneos, e de outras espécies animais (MOREIRA & AINOZ, 1978). A jacalina é específica a D-galactose e seus derivados e, análises de ligações de sacarídeos revelaram o reconhecimento da estrutura β -D-gal(1-3)DgalNac. SANTOS-DE-OLIVEIRA et al. (1994) a caracterizaram como uma molécula tetramérica, com massa molecular de 39,5 kDa, constituída pelas cadeias α e β , com massas moleculares de 11,8 e 14,7 kDa. Estas cadeias podem apresentar variações gerando isoformas (YOUNG et al., 1991).

A jacalina é um ligante das glicoproteínas IgA sérica e IgA secretora (ROQUE-BARREIRA & CAMPOS NETO, 1985), mais especificamente à subclasse IgA-1 humana. Liga-se também à IgD e possui atividade imunomoduladora sobre a resposta de IgE.

A ação mitogênica do extrato de semente de jaca sobre os linfócitos foi demonstrada por BUNN-MORENO & CAMPOS NETO (1981), os quais observaram seletividade para as células T. A ativação policlonal sobre os linfócitos B, somente ocorreu na presença de concentrações elevadas do extrato. MIRANDA-SANTOS et al. (1991b), no entanto, atribuíram toda a atividade mitogênica do extrato total de sementes de *Artocarpus integrifolia* à artocarpina.

SAXON et al., em 1987, utilizando a jacalina purificada, observaram que esta lectina exerceu atividade mitogênica sobre as células T. Porém, não houve ativação policlonal das células B, de forma T - dependente ou T - independente. Ao contrário, ocorreu inibição da produção de imunoglobulinas, mediada pelas células T supressoras.

PINEAU et al. (1990) também estudaram a atividade mitogênica da lectina purificada. Revelaram que a jacalina induz a proliferação de linfócitos T, CD4, e que a cinética de síntese de DNA, expressão de CD25 e a secreção de IL-2 foi distinta daquela observada após estimulação com PHA. A ativação dos linfócitos foi

dependente da população de monócitos autólogos e foi necessário maior tempo de reação.

LAFONT et al. (1997) demonstraram que, além da especificidade de ligação e ativação dos linfócitos CD4, a jacalina também se liga aos linfócitos T CD8. No entanto, a ativação da tirosina quinase p56lck, que está associada a CD4 e CD8, e a transdução do sinal até o núcleo da célula somente ocorre nos linfócitos CD4.

Segundo MIRANDA-SANTOS et al. (1991a), a jacalina estimula a produção de IL-3/GM-CSF, mas não outros fatores de crescimento. CRANE et al. (1984) demonstraram que hibridomas de células T, obtidos pela fusão de células T estimulados com jacalina e células T tumorais, secretam INF γ .

A jacalina tem atividade quimiotática sobre neutrófilos em camundongos Balb/c e CBA, após a sua administração intraperitoneal (SAKAMOTO et al., 1995a; FELIPE et al., 1995). A atividade quimiotática não ocorreu em camundongos suíços, C57B16 ou ratos. Isto sugere a existência de seletividade na quimiotaxia induzida por moléculas que reconhecem os carboidratos (SAKAMOTO et al., 1995a). Em camundongos suíços, FELIPE et al. (1995) demonstraram que a jacalina aumenta as células fagocitárias, principalmente macrófagos, em número e atividade. A ativação dos fagócitos foi dependente da liberação de citocinas de células T, provavelmente INF γ , tornando-os mais resistentes a infecção à *Cândida albicans*.

ALBUQUERQUE et al. (1995) demonstraram que a jacalina é um potente adjuvante sobre a resposta imune humoral contra o TNP sendo útil como carreador e imunoestimulante em protocolos de imunização.

FAVERO et al. (1993) e LAFONT et al. (1997) demonstraram que a jacalina, extraída das sementes de *Artocarpus heterophyllus*, estimula linfócitos T CD4, e que ao interagirem, em baixas concentrações com este receptor, inibe a infecção de células linfóides pelo HIV.

O uso da jacalina em diversas áreas tem como vantagem a sua abundante fonte, a facilidade de purificação e a sua estabilidade. Atualmente a jacalina está sendo empregada no isolamento de glicoproteínas plasmáticas, como IgA1 e

proteína inibidora de C-1, na investigação de nefropatias por IgA, na detecção de tumores e na avaliação da imunidade de indivíduos infectados com HIV (KABIR, 1998).

A presença de mais uma lectina no extrato total de sementes de *A. integrifolia* foi sugerida por MOREIRA & AINOUS (1981), ROQUE-BARREIRA & CAMPOS-NETO (1985) e COSTA (1989).

Segundo MIRANDA-SANTOS et al. (1991a) esta lectina pertence ao grupo ligante de D-manose e possui atividade estimulatória inespecífica sobre os linfócitos. Apresenta a propriedade de se ligar a hemáceas de carneiro e de coelho, porém não aglutina eritrócitos humanos, independente da especificidade. Sua massa molecular foi determinada como sendo de 65 kDa. Os autores a denominaram como artocarpina.

SANTOS-DE-OLIVEIRA et al. (1994) purificaram a lectina com especificidade a D-manose das sementes de *A. integrifolia* e a denominaram, provisoriamente, de KM^+ . A lectina purificada por este grupo foi caracterizada como uma molécula que possui massa molecular de 52 kDa, estruturada como uma molécula tetramérica, formada por cadeias de 13 kDa. A atividade aglutinante das hemáceas humanas dos grupos A, B ou O ocorreu na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ de lectina. Segundo esses autores, a lectina induz a migração de neutrófilos na cavidade peritoneal e *air pouch* em ratos e possui atividade quimiotática para neutrófilos *in vitro* (SAKAMOTO et al., 1995b).

Os trabalhos de MIRANDA-SANTOS et al. (1991a) e de SANTOS DE OLIVEIRA et al. (1994) revelaram que a lectina é mitogênica, induzindo a proliferação de células esplênicas de camundongos Balb/c. A ativação de linfócitos ocorre através de um mecanismo diferente da jacalina, como demonstrado em experimentos de inibição com anticorpos anti-CD2 e anti-CD3. Em experimentos realizados por ALIBERTI et al. (1995), KM^+ induziu a produção de altos níveis de $\text{INF}\gamma$, em células esplênicas de camundongos Balb/c ativadas, e de óxido nítrico por macrófagos isolados da cavidade peritoneal.

Em nosso trabalho denominamos a lectina com especificidade a D-manose, purificada do extrato total de sementes de *A. integrifolia*, de artocarpina. Somente a utilizamos no estudo de proliferação de fibroblastos *in vitro*.

OBJETIVOS

I - OBJETIVO GERAL

Considerando a inexistência, na literatura revista, de estudos que avaliassem a influência das lectinas sobre o processo de reparo, este trabalho teve como principal objetivo:

Avaliar a influência das lectinas, PHA de *Phaseolus vulgaris*, WGA de germe de trigo, *Triticum vulgare*, e jacalina de *Artocarpus integrifolia*, no processo de reparação de pele de ratos albinos, da linhagem Wistar.

II - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

i - Purificar as lectinas de *Artocarpus integrifolia* e de *Phaseolus vulgaris*, utilizando metodologia simples e de baixo custo comercial;

i - Avaliar macroscópica e histologicamente, uma possível influência das lectinas PHA, de *Phaseolus vulgaris*, WGA, de germe de trigo, *Triticum vulgare*, e jacalina, de *Artocarpus integrifolia*, no processo de reparação de pele de ratos;

iii - Induzir reação inflamatória, após injeção intradérmica das lectinas em ratos Wistar, e comparar a reação inflamatória local com os possíveis efeitos no processo de reparação;

iv - Avaliar a possibilidade das lectinas ativarem, diretamente, a proliferação de fibroblastos *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

I – OBTENÇÃO DAS LECTINAS

As lectinas purificadas foram a fitohemaglutinina (PHA) de *Phaseolus vulgaris*, variedade Goiano Precoce, a jacalina (JAC) e a artocarpina (ART) das sementes de jaca, *Artocarpus integrifolia*. PHA e artocarpina foram purificadas em matriz de ovomucóide preparada conforme padronização realizada por GONÇALVES & COSTA (1995), com pequenas modificações. A jacalina foi purificada em coluna de afinidade agarose- D- galactose (ROQUE-BARREIRA, 1986). A purificação foi avaliada por eletroforese e através da atividade hemaglutinante.

A lectina de germe de trigo (WGA) foi obtida da Sigma Chemical Company, cat. nº L- 1005.

I.1 – Preparo da matriz de ovomucóide

Para o preparo da coluna de afinidade utilizando ovomucóide como matriz foram necessárias as etapas de purificação, fixação e dessialização do ovomucóide e da montagem da coluna.

O ovomucóide foi purificado conforme metodologia proposta por LINEWEAVER & MURRAY (1947), com pequenas modificações. A um volume

de clara de ovo foram adicionados, sob constante agitação e nesta ordem, um quarto de volume de solução de ácido clorídrico 0,5 M (MERCK), a mesma quantidade de acetona P.A. (MERCK) e dois quartos do volume de água. Após agitação constante, por quinze minutos a 4°C, a mistura foi filtrada em papel de filtro por 18 horas, na mesma temperatura. O sobrenadante foi precipitado com dois volumes de acetona, recolhido em funil de Buchner e seco em estufa. O ovomucóide purificado tem rendimentos e perfil eletroforético semelhante ao obtido por LINEWEAVER & MURRAY (1947). O ovomucóide foi insolubilizado e triturado em partículas com diâmetro compreendido entre 50 e 250 μm , as quais foram fixadas com solução de glutaraldeído a 1%. Após sucessivas lavagens com solução salina, o material foi mantido por 12 horas a 4°C, em solução de glicina - HCL 0,02 M, pH 2,8. Após, foi lavado com água, dessializado através da fervura em pH ácido, lavado com água e posteriormente com PBS até neutralização do pH. A matriz foi acondicionada em uma coluna de vidro (volume total de 10 mL), acoplada a uma bomba de fluxo contínuo (Pharmacia, LKB, Pump P-1) e a um coletor de frações (FOXY 200, ISCO).

I.2 – Purificação das lectinas

Para obtenção de PHA, 100 mL do extrato total de sementes de *P. vulgaris* (GONÇALVES & COSTA, 1995) foram aplicados na matriz de ovomucóide. Após, a coluna foi lavada com PBS, até que a densidade ótica a 280 nm fosse menor que 0,1. A lectina foi eluída com tampão tetraborato de sódio 0,25 M, pH 8,0. O fluxo foi mantido em 12,0 mL/hora e as frações coletadas foram de 3,0 mL.

Para a purificação da artocarpina, 200 mL de extrato total de semente de jaca (100 g de sementes, sem cascas, trituradas, diluídas em 500 mL de PBS e centrifugadas a 2.000 g, a 4°C, por 20 minutos) foram aplicados à coluna de ovomucóide, cujo volume era de 10 mL. A lectina foi eluída com solução de manose

0,2 M preparada em solução salina. O fluxo foi mantido em 12,0 mL / hora sendo coletadas frações de 3,0 mL.

A jacalina, lectina presente no extrato salino da semente de jaca (obtido na proporção 1:5) foi purificada em coluna agarose- D- galactose (Selectin-16^(R), Pierce, USA). O volume total da matriz de afinidade foi de 3,0 mL e a lectina foi eluída com solução de D- galactose 0,4 M (Sigma).

As frações eluídas foram acompanhadas por meio de leitura espectrofotométrica a 280 nm e da atividade hemaglutinante. As frações que apresentaram leitura de absorbância acima de 0,4 foram reunidas, dializadas contra PBS sem conservantes, acertada a concentração para 1,0 mg / mL, esterilizadas em filtro de 0,22 m μ (Millipore) e mantidas congeladas em alíquotas de 500 μ L, até o momento de uso. As análises eletroforéticas e as atividades hemaglutinantes foram realizadas.

I.3 - Eletroforese

Com o objetivo de avaliar o grau de pureza das lectinas, foram realizadas análises eletroforéticas, em gel de poliacrilamida, pelo sistema mini - gel (Pharmacia, LKB, 205 Midget Electrophoresis Unit).

PHA foi submetida à eletroforese em pH ácido, em condições não desnaturantes (RESFIELD et al., 1962). A concentração do gel separador foi de 7% de acrilamida e a corrida foi realizada com amperagem e tempo fixos, de 30 mA por 90 minutos.

A jacalina e a artocarpina foram submetidas à eletroforese em condições alcalinas não desnaturantes (ALFENAS et al., 1991). O gel separador foi usado com 7,5% de acrilamida e a corrida foi realizada a 76V.

As três lectinas foram também submetidas ao sistema SDS-PAGE adaptado de LAEMMLI (1970) e comparadas a marcadores com massas moleculares baixas (BIO RAD, Low Range, cat. número 161.0304). As proteínas foram diluídas no

tampão de amostra, aquecidas e submetidas à corrida em um gel separador constituído por 12% de acrilamida (ALFENAS et al., 1991). A corrida foi realizada a 150 V, por quatro horas (fonte Pharmacia, EP 500/400). As massas moleculares foram determinadas através do sistema SigmaGel (Gel Analyses Software, Jandel Scientific Software, USA, 1995).

O corante utilizado foi Coomassie Brilliant blue – R 250 a 0,05%.

I.4 – Atividade hemaglutinante

Os procedimentos realizados para determinar o título de hemaglutinação foram semelhantes aos de COSTA (1989). Cada lectina foi diluída em série, na razão 2, mantendo um volume final de 100 μ L, em placas com fundo em “U”. Após, o mesmo volume da suspensão de hemáceas a 2%, formada por um *pool* de células dos grupos A, B, O e Rh positivas, foram adicionadas, homogeneizadas e deixadas em repouso por duas horas à temperatura ambiente. O título de aglutinação foi determinado, como sendo o inverso da maior diluição que forneceu aglutinação visível.

A atividade hemaglutinante específica foi definida como o título em relação ao teor de proteínas (FREIER et al., 1985).

I.5 – Determinação da concentração de proteínas

Para determinação da concentração das proteínas foi utilizado o método de Lowry (LOWRY et al., 1951) usando como padrão albumina bovina (BSA - fraction V, Pentax-Miles, USA). O conteúdo de proteínas nos eluatos das colunas foi avaliado através da absorbância a 280 nm.

II – EFEITO INFLAMATÓRIO DAS LECTINAS

II. 1 – Amostra

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

As lectinas utilizadas neste experimento foram PHA, WGA e a jacalina.

II. 2 - Procedimentos experimentais

Para avaliar a resposta inflamatória induzida pelas lectinas, injeções intradérmicas foram realizadas no dorso dos animais. As avaliações macroscópicas foram determinadas, através da medida dos diâmetros das pápulas formadas no local da injeção. As análises histológicas foram realizadas em cortes corados com hematoxilina - eosina.

II.2.1 – Determinação da dose adequada

Para definir a melhor dose para cada lectina, foram utilizados quatro grupos com três animais cada. Em cada animal foram realizadas três injeções de 100 μ L com a solução estéril da lectina, nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 μ g/mL. Uma injeção com o mesmo volume de solução salina fisiológica, utilizada como controle, também foi realizada. Antes da injeção, os animais foram anestesiados com éter etílico e depilados manualmente, apenas no local da injeção.

As medidas dos diâmetros das pápulas foram realizadas durante o período compreendido entre o primeiro e o sétimo dias. Para a medida, as pápulas foram

primeiramente delimitadas com caneta esferográfica. Ao riscar a pele com a caneta, esta escorrega na pele normal mas fica presa na região edemaciada ou endurecida pela reação celular. Como este procedimento foi realizado a partir de diferentes posições, a área delimitada adquiriu um formato circular. O diâmetro delimitado com a caneta esferográfica foi medido utilizando círculos com tamanhos previamente definidos (1 a 20 mm) e impressos em uma transparência.

As doses foram escolhidas em função do diâmetro da pápula formada após 24 horas e da não formação de necrose. Foi padronizado, como diâmetro inicial, aproximadamente 10 mm. As doses consideradas adequadas (25 μ g para PHA e jacalina e 100 μ g para WGA) foram utilizadas nos experimentos que visavam acompanhar, através da análise histológica, os possíveis efeitos das diferentes lectinas no processo inflamatório.

II.2.2 - Reação inflamatória

Para cada lectina foram estabelecidos, de forma aleatória, cinco grupos experimentais, contendo dois animais cada. Em cada animal foram realizadas três injeções intradérmicas, no dorso, na região interescapular, sendo duas teste e uma controle. A posição das injeções controle e teste foram aleatórias.

Os animais foram anestesiados e sacrificados 24 horas, 48 horas, 72 horas, no quinto e no sétimo dias após a injeção. Nestes períodos, após a delimitação da pápula, a região da pele inflamada foi removida com margem de segurança. A pele foi conservada em formol a 4%, até que a confecção das lâminas, para a análise histológica, fosse realizada. As peças ficaram no mínimo 72 horas nesta solução.

As peças mantidas em formol foram cortadas ao meio e preparadas de forma a conter uma região de tecido inflamado circundada pelo tecido normal. As peças foram lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Cortes de 7,0 μ m foram realizados e as lâminas foram coradas com hematoxilina - eosina para avaliação das características celulares, nas reações inflamatórias.

As análises microscópicas e as fotografias foram realizadas em fotomicroscópio “Zeiss – Pol 01”.

III – CULTURA DE FIBROBLASTOS

III.1 – Células

Os fibroblastos humanos foram obtidos da gengiva de voluntários clinicamente normais e foram gentilmente cedidos pelo Prof. Ricardo Della Coleta da Disciplina de Patologia da FOP.

As células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagles's Medium - Sigma Chemical Co.), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cutilab - Campinas), anfotericina B e garamicina, em garrafas de 15 mL ou 50 mL. Os subcultivos foram realizados uma ou duas vezes por semana. As células foram desprendidas com solução de tripsina 0,1%, contendo EDTA 1,0 mM, até à décima quinta passagem (DOHLMAN et al., 1985). Nos experimentos foram utilizadas as células da sexta à décima quarta passagem.

O formato das células, a adesão e o índice de proliferação, nas garrafas ou durante os experimentos em placas de cultura, foram acompanhados em microscopia de inversão e contraste de fase (Microscópio Reichert-Jung, Biostar).

III.2 – Lectinas

As lectinas utilizadas foram as lectinas de *P. vulgaris* (PHA), de germe de trigo (WGA) e das sementes de jaca (jacalina e artocarpina).

As lectinas foram diluídas no meio de cultura ou em PBS e utilizadas nas concentrações finais de 0,1 µg/mL a 300 µg/mL, após serem esterilizadas em filtro Amicon de 0,22 µm (Millipore).

III.3 – Ensaio de toxicidade

Para verificar se as lectinas exerciam efeito tóxico sobre os fibroblastos, ensaio baseado no trabalho de ASAGA & YOSHIZATO (1992) foi realizado.

Uma suspensão contendo 10^4 células/mL foi diluída no meio de cultura, no qual as lectinas haviam sido previamente diluídas, nas concentrações desejadas. O volume final foi de 100 μ L. As placas foram incubadas em condições de temperatura, umidade e nível de CO₂ adequados, por vinte e quatro horas, e o ensaio colorimétrico foi realizado para avaliar a viabilidade das células.

III.4 - Ensaio de proliferação

Os ensaios de proliferação sob a influência das lectinas foram baseados nos trabalhos de WEISER & OESCH (1988), com algumas modificações.

As células foram lavadas com o meio de cultura e a concentração da suspensão celular foi acertada em câmara de Newbauer. As suspensões contendo 4×10^3 células / mL foram colocadas nas placas, num volume final de 100 μ L. Para completa adesão, as células foram mantidas em estufa por dezesseis horas, em condições de umidade adequada, temperatura de 37°C e atmosfera com 5% de CO₂. Trocas diárias dos meios, com ou sem as lectinas (teste e controle, respectivamente), foram realizadas três vezes. No último dia, foi realizado o ensaio colorimétrico com MTT, para detectar o grau de proliferação celular.

Os ensaios foram realizados em placas estéreis contendo noventa e seis poços (Falcon 3075, Becton Dickinson Labware). Quatro experimentos distintos foram realizados e cada análise foi feita em triplicata.

III.5 – Ensaio de adesão

Para avaliar o grau de influência das lectinas, sobre a adesão das células às placas de poliestireno, o ensaio foi realizado conforme OPPENHEIMER-MARKS & GRINNEL (1981), com modificações nos tempos de incubações.

As placas de cultura foram pré - sensibilizadas com as soluções das lectinas diluídas em PBS nas concentrações desejadas. Cem microlitros destas soluções foram adicionados à placa, as quais foram mantidas à temperatura ambiente por duas horas. Após este período, as placas foram lavadas com PBS e foram adicionados, à cada poço, 100 μ L da suspensão celular, contendo 10^4 células / mL. Após dezesseis horas em estufa, nas condições de temperatura, umidade e níveis de CO₂ adequados, o ensaio colorimétrico foi realizado.

Foram realizados três experimentos distintos e cada análise foi feita em triplicata.

III.6 – Revelação - Ensaio colorimétrico

Para avaliar o grau de proliferação ou de adesão dos fibroblastos *in vitro*, foi utilizado o ensaio colorimétrico utilizando o MTT, proposto por MOSMANN (1983).

O ensaio baseia-se na habilidade das células viáveis em absorverem sais de tetrazolium e clivarem o anel de tetrazolium pela mitocôndria ativa formando um produto de coloração azul escura, cuja intensidade é proporcional à concentração celular. O grau de proliferação celular é proporcional ao grau de viabilidade celular e portanto ao produto colorido formado. O ensaio quantitativo é rápido, preciso (MOSMANN, 1983) e sensível (GIENI et al., 1995).

Após o tempo adequado de incubação das placas, nas quais os ensaios de proliferação ou adesão estavam sendo realizados, o sobrenadante da cultura foi aspirado. Cem microlitros do meio de cultura foram adicionados em cada poço e 40

μL da solução de MTT [(3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyl tetrazolium bromide)] (Serva-Feinbiochemica-Heidelberg, catálogo número 20395), dissolvidos em PBS a uma concentração final de 5mg/mL, foram adicionados. As placas foram envolvidas em papel alumínio e incubadas a 37°C por quatro horas. Após este período, o sobrenadante foi descartado e 100 μL de solução álcool - ácida (200 μL da solução de HCl - 1N em 4,8 mL de álcool isopropílico) foram adicionados com o propósito de dissolverem os cristais de formazan formados, de coloração azul escuro. Após 20 minutos de incubação à temperatura ambiente para assegurar completa dissolução dos cristais, todo o volume foi repassado para a placa de ELISA, sobre 20 μL de solução de SDS a 3%. A leitura foi então realizada em leitor de ELISA (Microplate Reader, Biorad, model 450) a 490 nm.

O comprimento de onda utilizado (490 nm) foi diferente do recomendado pela técnica original (570 nm), pois foi adaptado às nossas condições laboratoriais. Para assegurar a sensibilidade e a linearidade de resposta neste comprimento de onda, testes preliminares foram realizados. Para tanto, diferentes concentrações da suspensão celular (10^3 até 8×10^4 células / mL) foram diluídas em meio de cultura e dispensadas em triplicata, num volume final de 100 μL . A placa de cultura foi incubada em estufa em condições adequadas à proliferação celular por 24 horas, após o qual foi realizado o ensaio colorimétrico com a leitura da densidade ótica à 490 nm. A relação entre as leituras de absorbância e a concentração celular foi avaliada através de um modelo linear.

IV – INFLUÊNCIA DAS LECTINAS SOBRE A REPARAÇÃO

IV.1 – Amostra

Foram utilizados para este estudo, 36 ratos albinos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, com idade aproximada de 90 dias e pesando

em média 300 gramas. Os animais foram procedentes do Biotério Central da Unicamp e foram mantidos em gaiolas apropriadas e individuais, em ambiente com temperatura e umidade controladas. A alimentação constou de ração balanceada padrão e água *ad libitum*.

As lectinas utilizadas foram PHA, WGA e a jacalina. Para cada lectina, os animais foram divididos em quatro grupos, contendo três animais por grupo.

IV.2 – Procedimentos experimentais

Foram baseados nos procedimentos previamente realizados por KUBOTA et al. (1985) e SOUBHIA et al. (1992), com modificações.

De forma aleatória foram formados os grupos experimentais, contendo cada grupo, três animais. O primeiro grupo foi sacrificado no terceiro dia, o segundo grupo no sétimo dia, o terceiro no décimo primeiro dia e quarto no décimo quinto dia.

No dia zero, cada animal foi anestesiado por via intramuscular, num volume de 1,16 μL por peso do rato em gramas, com uma mistura de Virbaxyl^(R) 2% e Francotar^(R), xylazina a 20 mg / mL e ketamina a 50 mg / mL, na proporção de 0,3:0,8 mL.

O dorso de cada animal foi depilado manualmente e quatro excisões, duas a esquerda e duas a direita da região correspondente a coluna vertebral, foram realizadas com *punch* cirúrgico de 8,0 milímetros. Cada ferida foi realizada de forma a manter tamanho e profundidade o mais próximo possível uma das outras, sendo realizada pelo mesmo operador. Quando retirado o tecido, observou-se como base da ferida, o tecido muscular e nas bordas, a presença da derme e epiderme. As feridas foram lavadas com solução salina estéril e secas com gaze, para retirar o sangue e evitar a formação de coágulo.

Três ferimentos foram escolhidos, aleatoriamente, para a aplicação da lectina constituindo o teste, e um ferimento foi escolhido para constituir o controle. No

controle foram aplicados 100 μ L da solução salina fisiológica, em cada dia. Nas feridas teste foram aplicadas, no mesmo volume, a lectina estéril e na concentração inicial de 1,0 mg/mL. As aplicações das lectinas e da salina no controle foram realizadas com pipeta automática de 25 μ L, durante três dias consecutivos (dias zero, um e dois). Foram aplicados 300 μ g/mL de cada lectina e 300 μ L de solução salina fisiológica, por ferimento.

Para acompanhar, macroscopicamente, o processo de retração das feridas, o diâmetro dos ferimentos foi medido diariamente, do primeiro ao décimo quinto dia. Para a realização das medidas, círculos com diâmetros definidos e impressos em uma transparência, foram colocados sobre os ferimentos. A média das medidas dos diâmetros que mais se aproximavam da cicatriz foi considerada. A variação dos valores dos diâmetros foi avaliada estatisticamente, pelo teste *t* de Student. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

A figura 1 representa como foram realizadas as medidas dos diâmetros das feridas em reparação.



Figura 1 - Medida dos diâmetros das feridas em reparação.

As análises histológicas da reparação tecidual foram realizadas apenas nos dias 3, 7, 11 e 15. Para a obtenção das peças, os animais foram sacrificados com éter etílico e a região da pele que continha o ferimento foi retirada. Cada peça foi obtida

de forma que a região de reparação central fosse circundada por tecido normal. As incisões para a retirada das peças tiveram a mesma profundidade daquelas realizadas nos ferimentos.

As peças foram identificadas e mantidas em recipientes com solução a 4% de formol, até o momento de serem processadas. As peças ficaram, no mínimo, 72 horas nesta solução.

IV. 3 – Preparo das lâminas e análise histológica

As peças, mantidas em formol, foram cortadas ao meio. Assim, a região de tecido normal continha a região de ferida em reparação no centro. Após, foram lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e incluídas em parafina. Cortes de 7,0 μm foram realizados e as lâminas foram montadas. As lâminas foram divididas em dois lotes distintos para que os procedimentos de coloração fossem realizados.

Um lote de lâminas foi corado pela hematoxilina - eosina, conforme a técnica de rotina, com o objetivo de analisar a morfologia do tecido e a formação do tecido de granulação.

O segundo lote foi submetido a impregnação pela prata, conforme técnica de Gordon & Sweet (1936), segundo PEARSE (1985). Esta técnica permitiu o exame dos feixes de colágeno, através da microscopia de polarização.

As observações morfológicas do tecido de granulação, as observações em microscopia de polarização e as fotografias foram realizadas no fotomicroscópio "Zeiss - Pol 01".

RESULTADOS

I - PURIFICAÇÃO DAS LECTINAS

As lectinas PHA e artocarpina foram purificadas em cromatografia de afinidade, utilizando ovomucóide como matriz. A coluna foi preparada conforme metodologia proposta por GONÇALVES & COSTA (1995), com modificações no processo de obtenção do ovomucóide. O perfil eletroforético do ovomucóide em gel de agarose, é mostrado na Figura 2. Não foram observadas diferenças nos perfis eletroforéticos do ovomucóide obtido por meio das duas técnicas.

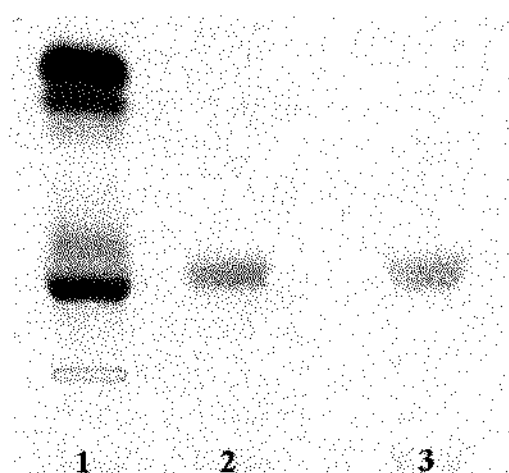


Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose, mostrando o perfil da clara de ovo total (1), do ovomucóide obtido segundo a técnica de LINEWEAVER & MURRAY (2) e do ovomucóide purificado com as modificações (3).

Os perfis de eluição de PHA, da artocarpina e da jacalina estão apresentados nas Figuras 3, 4 e 5, respectivamente. As frações que apresentaram absorvância acima de 0,4 à 280 nm e aglutinação positiva foram reunidas, dialisadas e esterilizadas. A concentração foi depois ajustada a 1,0 mg/mL.

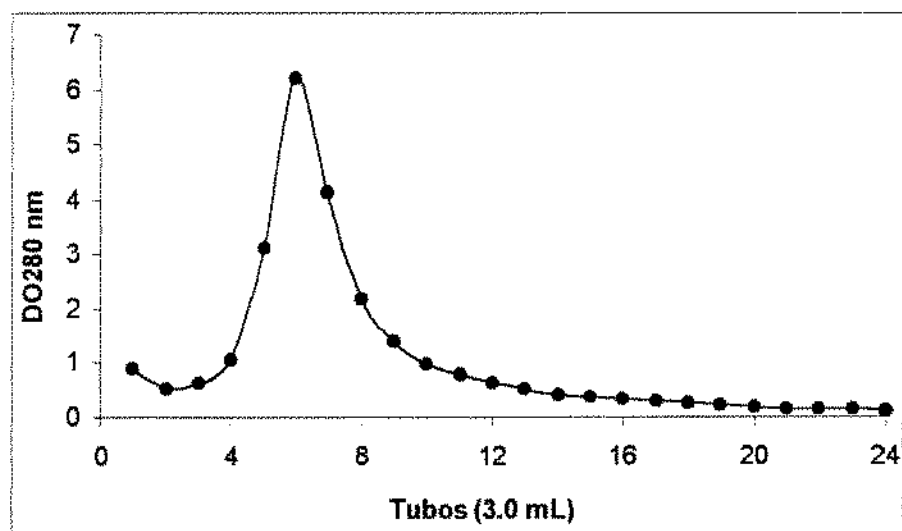


Figura 3 - Perfil de eluição de PHA.

Cem mL de extrato total foram aplicados à uma coluna de 10 mL, com matriz de afinidade preparada com ovomucóide. A lectina foi eluída com tampão tetraborato de sódio 0,25 M, pH 8,0. A aglutinação foi observada em todas as frações eluídas. Foram reunidas as frações correspondentes aos tubos 4 a 9.

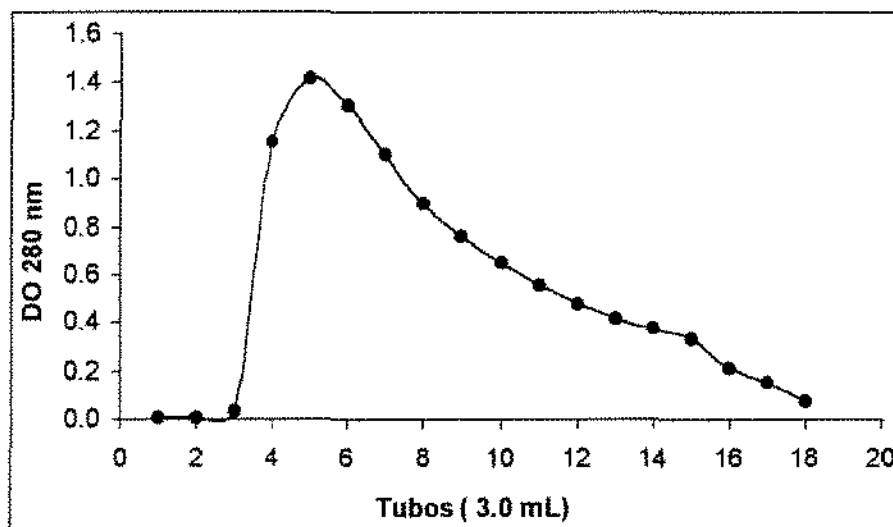


Figura 4 - Perfil de eluição da artocarpina.

O extrato total da semente de jaca foi aplicado à coluna de ovomucóide e a jacalina foi eluída com solução de D-manose 0,2 M, preparada em solução salina. Uma fraca aglutinação positiva foi observada nas frações referentes aos tubos 4 ao 8.

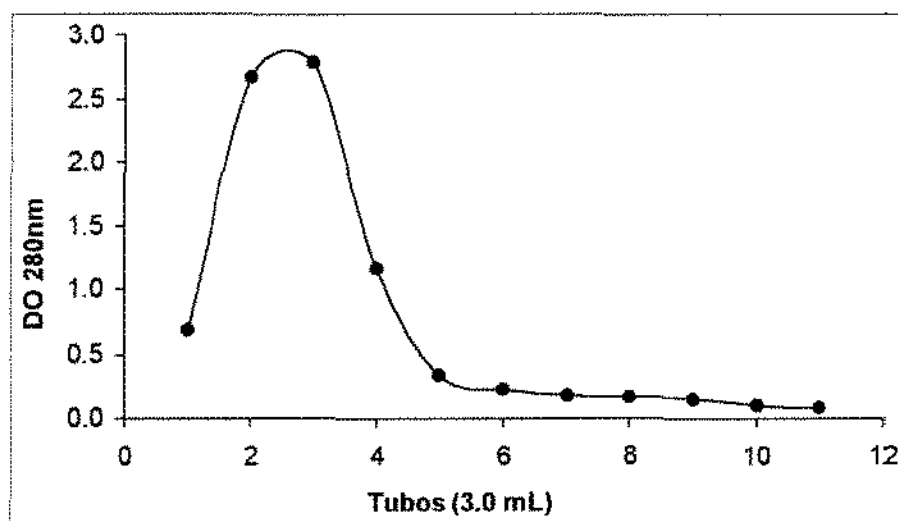


Figura 5 - Perfil de eluição da jacalina.

Vinte mL de extrato total de semente de jaca foram aplicados à coluna de afinidade agarose-D-galactose e eluídos com solução de D- galactose. Somente as frações referentes aos tubos 2, 3 e 4 apresentaram aglutinação positiva.

Na Tabela 1 estão reunidas as propriedades hemaglutinantes das três lectinas purificadas e da lectina WGA, obtida da Sigma.

Tabela 1- Propriedades hemaglutinantes das lectinas.

Lectina	Concentração protéica (mg/mL)		Título de aglutinação	Atividade hemaglutinante específica	Concentração mínima capaz de aglutinar (µg/mL)
	Lowry	DO280nm			
PHA	1,16	1,35	256	221,1	4,52
ART	0,77	0,83	32	41,5	24,13
JAC	1,45	1,75	8192	5637,9	0,18
WGA	1,38	1,30	32	23,1	43,25

Para avaliar a pureza das lectinas, eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada. Os perfis eletroforéticos das proteínas estão apresentadas nas Figuras 5 e 6. As massas moleculares foram avaliadas pelo sistema SDS-PAGE.

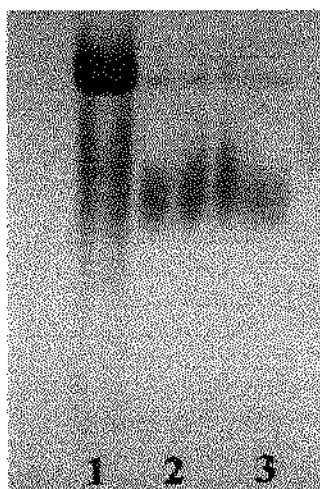


Figura 6 – Eletroforese em pH ácido e condições não desnaturantes, mostrando o perfil eletroforético do extrato total das sementes de *P. vulgaris* (1) e os perfis resultantes de duas repetições da purificação de PHA (2 e 3).

No gel separador a 7,0% foram aplicados 10 a 100 µg de proteínas, as quais foram submetidas à separação por 30 mA a 90 minutos. O tampão de corrida usado foi β-alanina - ácido acético 0,35 M, pH 4,5.

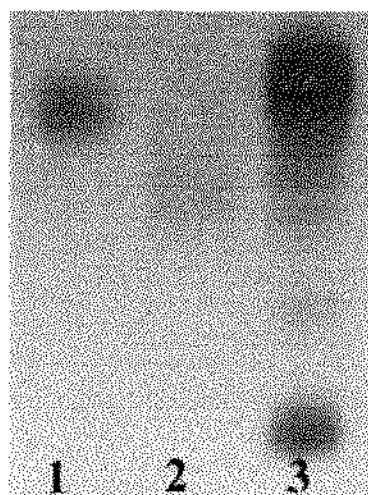


Figura 7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5%, em condições alcalinas, não desnaturantes, mostrando o perfil eletroforético da jacalina (1) da artocarpina (2) e do extrato total das sementes de jaca (3).

No gel separador foram aplicados 20 a 100 μ g de proteínas. As proteínas foram submetidas à separação, por 120 minutos a 76 V. O tampão de corrida usado foi Tris - glicina, pH 8,6.

Através da eletroforese em SDS-PAGE, foram determinadas as massas moleculares das lectinas. As massas moleculares identificadas para as isolectinas de *P. vulgaris* foram identificadas como compreendidas entre 33 e 35,5 kDa. Para a artocarpina, próximo a 13,5 kDa. Para a jacalina foram identificadas duas bandas, uma próximo a 12,1 e outra a 15,3 kDa.

II - EFEITO INFLAMATÓRIO

Uma possível reação inflamatória local provocada pelas lectinas PHA, WGA e jacalina foi investigada. Inicialmente foi definida a dose adequada para a aplicação das lectinas. A concentração adequada foi determinada como sendo aquela que fornecesse uma reação macroscópica, semelhante entre elas, após vinte e quatro horas, ou seja, foi padronizado em função de um diâmetro inicial igual a 10 mm. Também foi considerada a não formação de necrose, no local da injeção.

II.1 - Análise macroscópica

A Figura 8 representa as medidas das pápulas formadas nos locais de aplicação das lectinas.

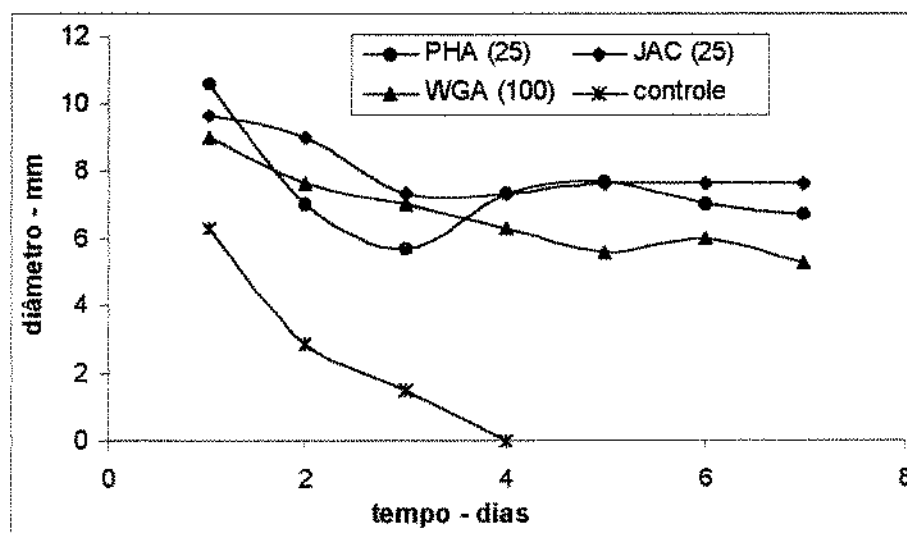


Figura 8 - Análise macroscópica da reação inflamatória local provocada pelas lectinas.

As medidas foram determinadas por um período de sete dias. As concentrações usadas foram igual a 25 $\mu\text{g/mL}$, para as lectinas PHA e jacalina, e a 100 $\mu\text{g/mL}$, para WGA.

As respostas inflamatórias induzidas pelas lectinas PHA e jacalina foram semelhantes nesta concentração. Quando a lectina PHA foi aplicada em doses maiores, um aumento da reação macroscópica ocorreu proporcionalmente. No entanto, quando a jacalina foi aplicada em doses maiores, as medidas macroscópicas da reação inflamatória local revelaram pouca diferença (resultados não mostrados).

Tanto na resposta inflamatória induzida por PHA como na induzida por jacalina foram observadas diminuição no tamanho das pápulas nos três primeiros dias, embora o decréscimo fosse mais acentuado para PHA. Quando PHA foi administrada, o diâmetro da pápula aumentou no quarto e quinto dias e decresceu no sexto e sétimo dias. No grupo injetado com jacalina, a alteração do diâmetro da pápula foi menos acentuada durante todo o período analisado. A formação de necrose no local da injeção foi observada em alguns locais de aplicação, para ambas as lectinas.

A resposta inflamatória induzida após injeção de WGA foi bem menor. Para que fosse formada reação inicial, macroscopicamente similar às demais, uma concentração quatro vezes superior foi utilizada. O diâmetro da reação diminuiu lentamente, durante todo o período analisado, sendo bem menor no sétimo dia. Em alguns locais de aplicação houve formação de necrose.

Nas primeiras 24 horas há formação de pápula conseqüente do efeito de injeção do veículo. No segundo e terceiro dias o diâmetro da pápula diminui, desaparecendo no quarto dia. Neste período a formação de pápula é evidenciada em todos os locais de injeção das lectinas.

II.2 - Análise histológica

As análises histológicas foram realizadas após coloração com hematoxilina – eosina. As análises foram realizados nos períodos de 24, 48 e 72 horas, 5 e 7 dias, após a injeção.

Período: 24 horas**Grupo Controle**

Neste grupo não foi observada reação inflamatória. O tecido apresentou organização normal estando presentes fibroblastos e fibras colágenas organizadas. Em algumas regiões ocorreu a separação das fibras de colágeno, possivelmente decorrentes da injeção de solução salina (Figura 9).

Grupo Teste

Nos animais do grupo injetado com PHA foram observadas reações inflamatórias com predominância de células mononucleares, principalmente linfócitos. Leucócitos polimorfonucleares estavam presentes em pequena proporção. Embora bem localizada no ponto de injeção, quando comparada com a reação induzida pela jacalina, a inflamação ocorreu em maior extensão (Figuras 10 e 13).

A reação inflamatória provocada pela jacalina foi menos intensa que a do grupo da PHA. Houve predominância de células mononucleares, principalmente linfócitos, bem concentrada na região de aplicação e restrita entre o músculo e a derme (Figuras 11 e 14).

A resposta inflamatória induzida por WGA foi mais intensa quando comparada com os grupos anteriores. No local de injeção observamos proporções semelhantes de células mononucleares e de polimorfonucleares (Figuras 12 e 15).

Período: 48 horas**Grupo Controle**

Tecido com organização normal, sem reação inflamatória (Figura 16).

Grupo Teste

Na reação induzida por PHA foi observado um infiltrado inflamatório ligeiramente maior que o anterior, predominando as células mononucleares (Figura 17).

O perfil da reação inflamatória provocada pela jacalina foi muito semelhante ao de PHA, também mais intenso que no período anterior (Figura 18).

Ao contrário, a reação inflamatória em resposta a injeção de WGA foi muito fraca. Predominaram as células mononucleares. Foi observada a formação de necrose, porém o epitélio abaixo está bem formado (Figura 19).

Período: 72 horas

Grupo Controle: Tecido com organização normal (Figura 20).

Grupo Teste

Neste período, a reação inflamatória para as lectinas PHA e jacalina foi bem menor, permanecendo localizada na hipoderme (Figuras 21 e 22). No grupo tratado com WGA a reação foi bem mais fraca podendo ser considerada praticamente normal (Figura 23).

Período: Cinco dias

Grupo Controle: Tecido sem reação inflamatória (Figura 24).

Grupo Teste

Neste período ainda foram evidenciadas células inflamatórias nos grupos tratados com PHA e jacalina, embora em quantidade comparativamente menor para o grupo da jacalina (Figura 25 e 26, respectivamente). No grupo tratado com WGA ainda estão presentes algumas células inflamatórias em alguns cortes, embora na maioria o tecido apresenta-se com características de tecido normal (Figura 27).

Período: Sete dias

Após sete dias de injeção das lectinas, ainda foram observadas reações inflamatórias fracas para os grupos das lectinas PHA e jacalina (Figura 28 e 29). Os locais de injeção com WGA apresentaram-se com aspecto normal, sem infiltrado inflamatório (Figura 30).

Reação inflamatória local, induzida após injeção intradérmica das lectinas. Coloração com hematoxilina – eosina. O aumento original das fotografias foi de $6,3 \times 1,25 \times 10$ ou, quando indicado, de $16 \times 1,25 \times 10$.

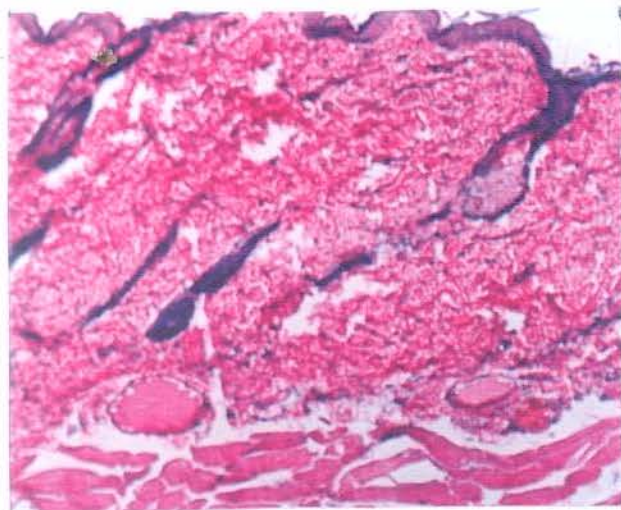


Figura 9
Controle – 24 horas

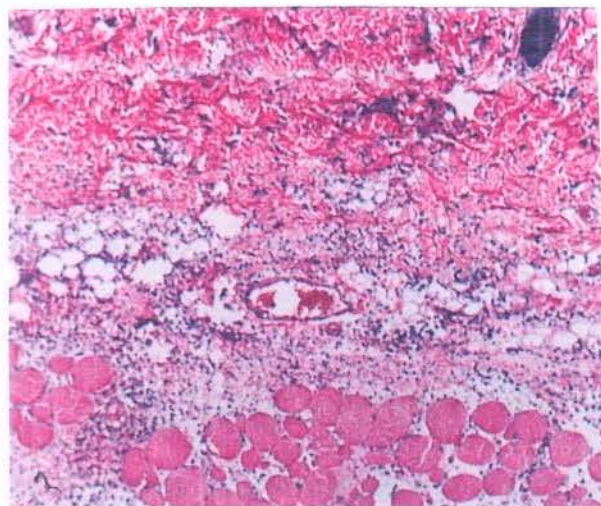


Figura 10
PHA – 24 horas

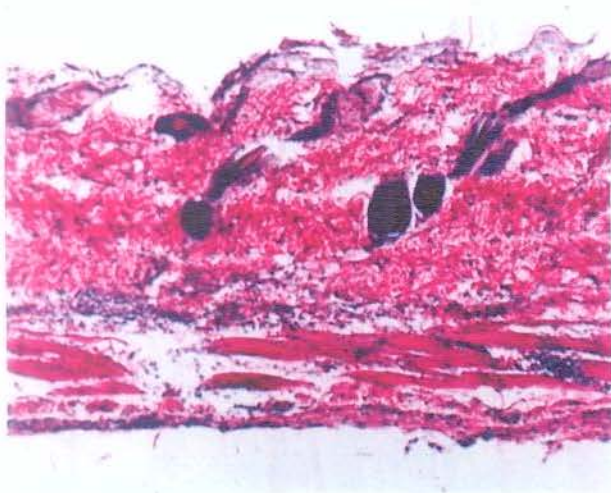


Figura 11
Jacalina – 24 horas

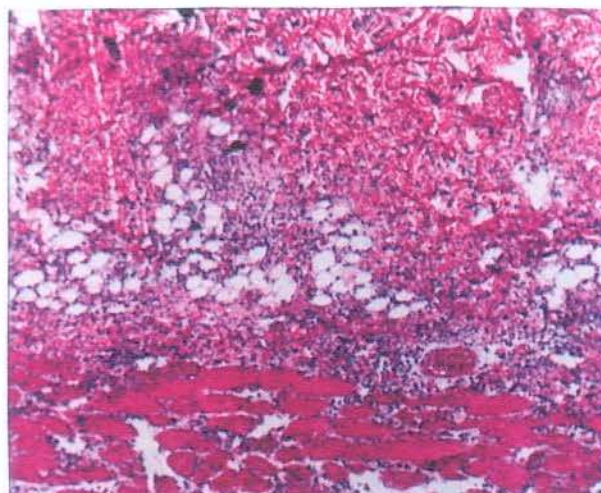


Figura 12
WGA – 24 horas

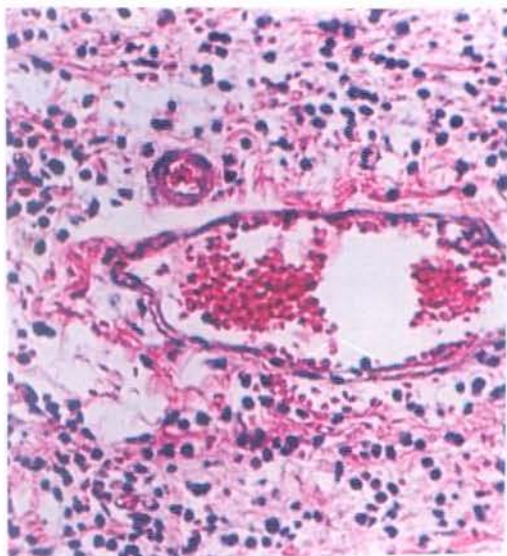


Figura 13
PHA – 24 horas
(16 x 1,25 x 10)

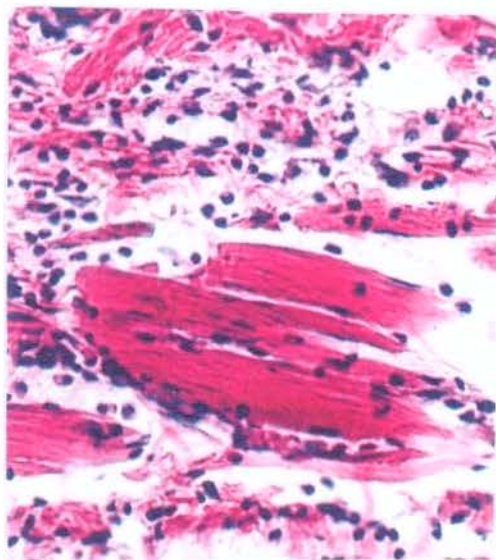


Figura 14
Jacalina – 24 horas
(16 x 1,25 x 10)

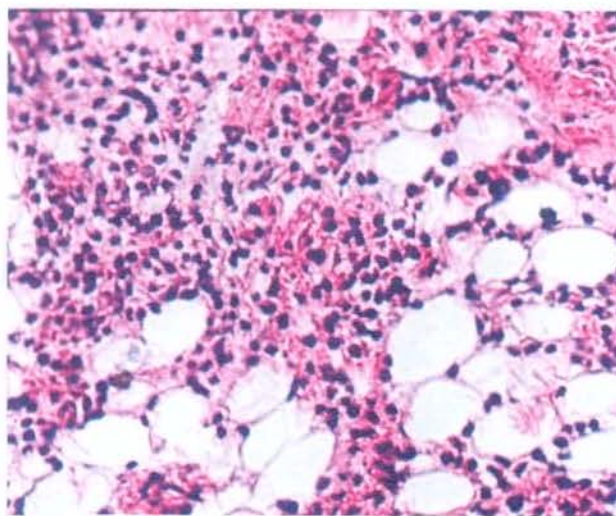


Figura 15
WGA – 24 horas
(16 x 1,25 x 10)

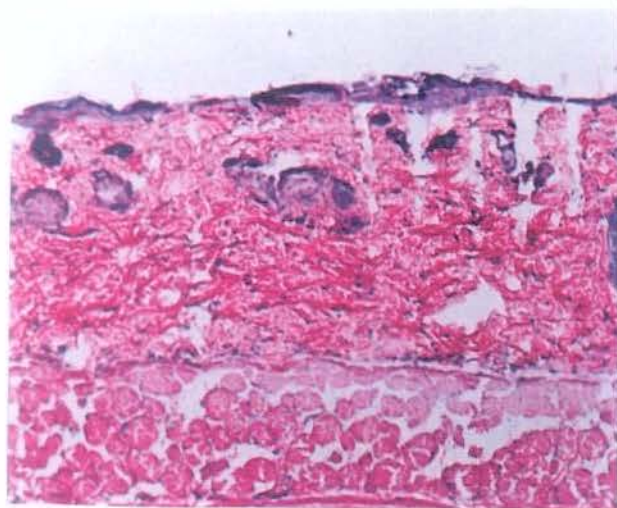


Figura 16
Controle – 48 horas

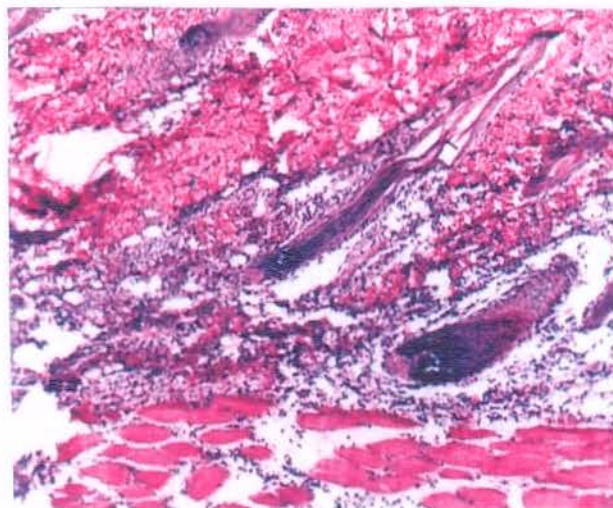


Figura 17
PHA – 48 horas

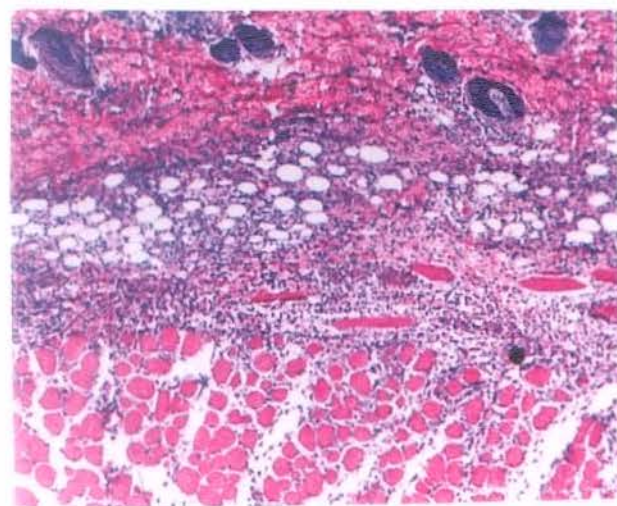


Figura 18
Jacalina– 48 horas

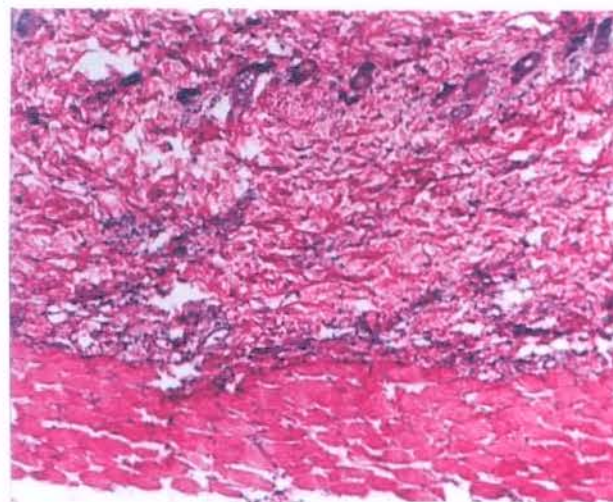


Figura 19
WGA - 48 horas

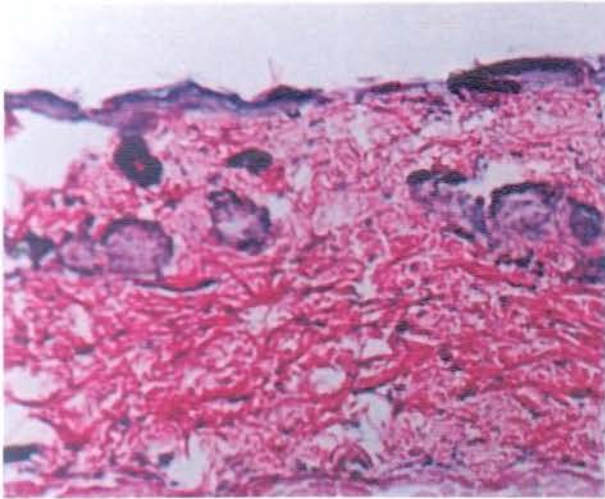


Figura 20
Controle – 72 horas

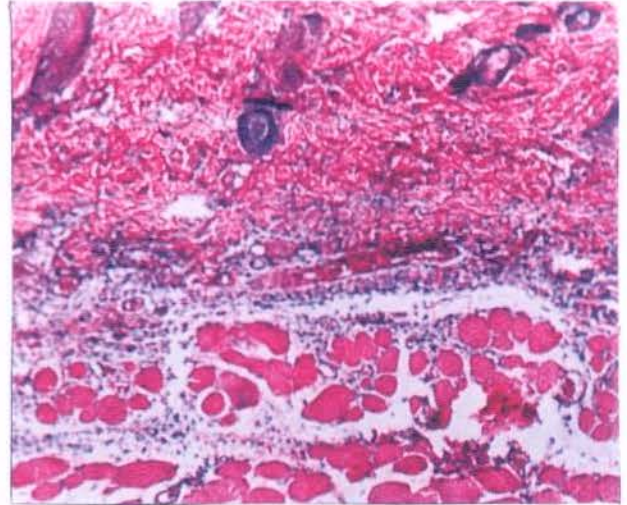


Figura 21
PHA – 72 dias

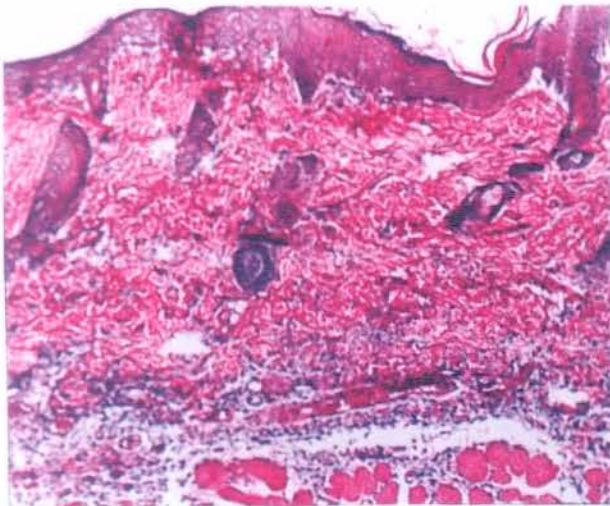


Figura 22
Jacalina – 72 horas

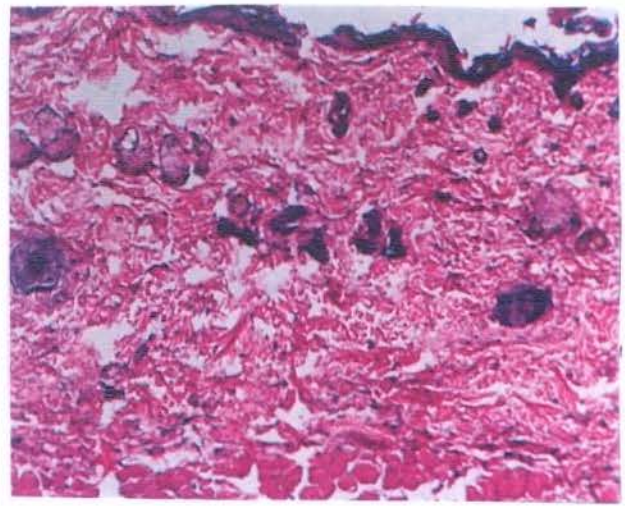


Figura 23
WGA – 72 horas

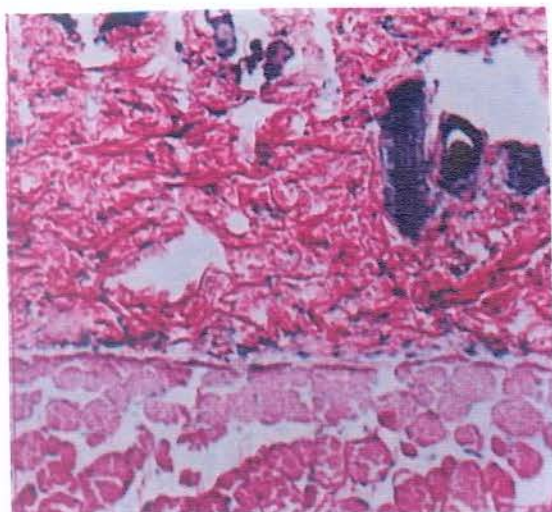


Figura 24
Controle – 5 dias

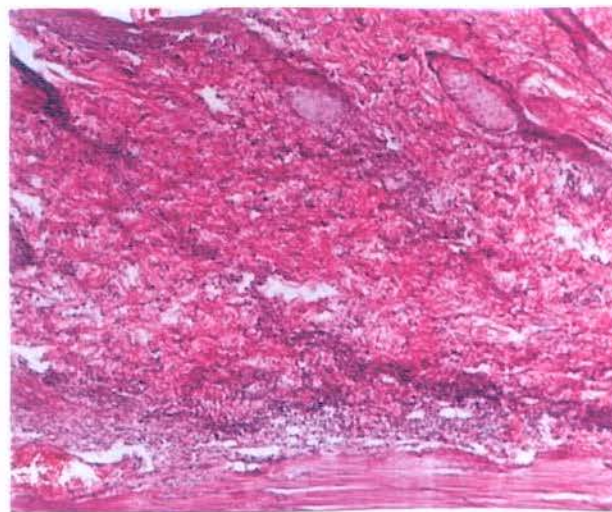


Figura 25
PHA – 5 dias

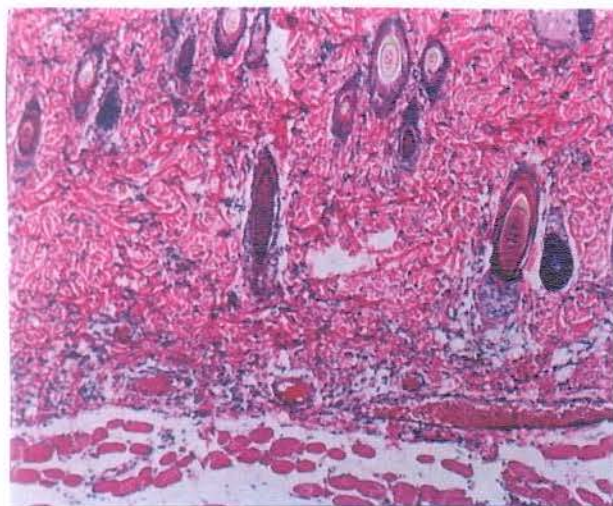


Figura 26
Jacalina – 5 dias

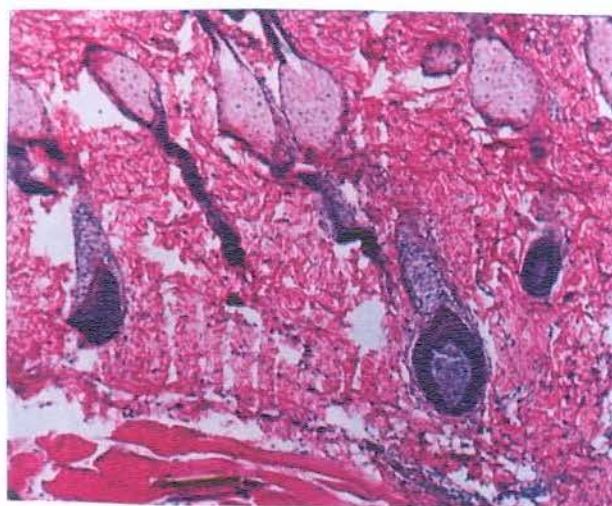


Figura 27
WGA – 5 dias

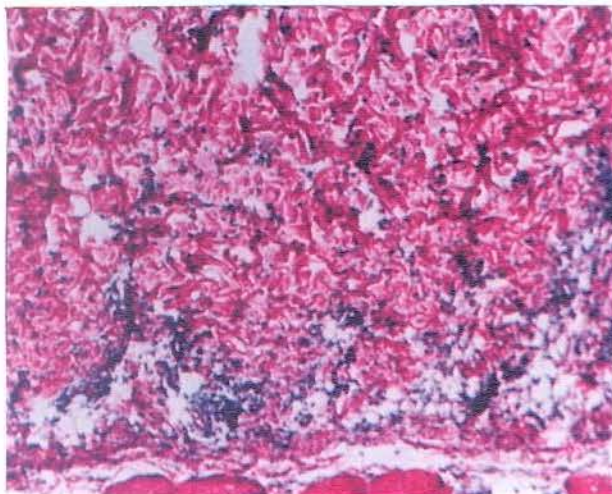


Figura 28
PHA – 7 dias

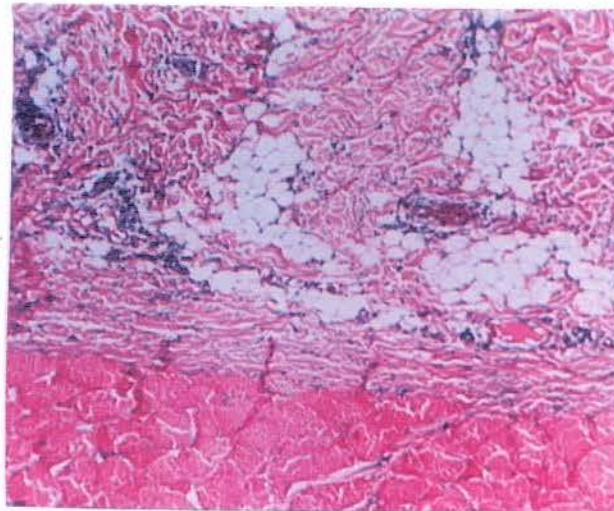


Figura 29
Jacalina – 7 dias

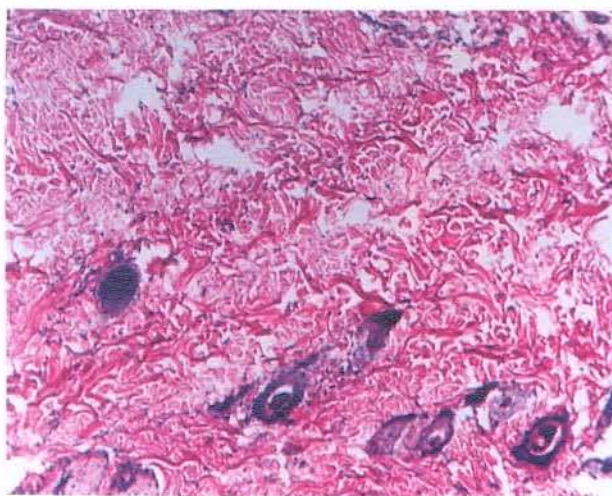


Figura 30
WGA – 7 dias

III - CULTURA

Os ensaios de proliferação dos fibroblastos *in vitro* foram avaliados através da técnica colorimétrica utilizando o MTT. Como o comprimento de onda utilizado nos experimentos foi diferente do estabelecido pela técnica original, a sensibilidade e a linearidade, determinada no comprimento de onda de 490 nm, foram avaliadas. O resultado foi apresentado na Figura 31.

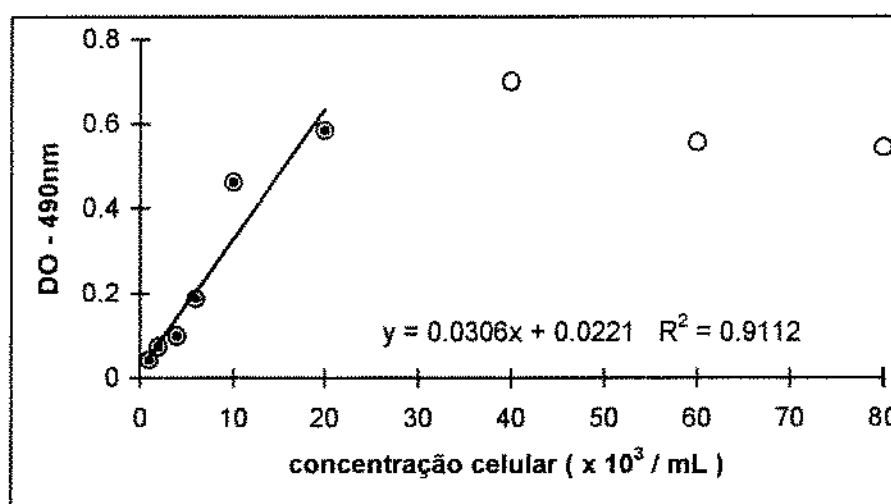


Figura 31 - Avaliação da linearidade do ensaio colorimétrico com MTT. Leitura em comprimento de onda de 490 nm. Modelo linear ajustado aos seis primeiros pontos experimentais.

Pode-se verificar na Figura 31 que a relação entre as leituras de absorbância a 490 nm e a concentração celular, para valores até 20×10^3 , foi adequadamente descrita ($R^2 = 0,91$) por um modelo linear. A equação da reta ajustada aos pontos experimentais é mostrada na Figura 31. Acima desta concentração, a relação entre as variáveis deixa de ser linear, ocorrendo redução da absorbância para os maiores valores de concentração. Este fato pode estar associado à inibição do crescimento celular em função do contato célula - célula (WEISER & OECHI, 1988 e WEISER et al., 1995).

O modelo linear ajustado aos pontos experimentais obtidos para concentrações celulares de até 20×10^3 , conforme mostrado na Figura 31, é estatisticamente significativo a nível de 1%. Desta forma, pode-se concluir que a variável dependente (absorbância) é altamente sensível às variações da variável independente (concentração celular), nesta faixa de valores, o que atesta a sensibilidade do método empregado.

Como foi demonstrado que os ensaios de proliferação poderiam ser avaliados neste comprimento de onda, procedemos aos demais experimentos.

Ensaio preliminares foram ainda realizados para avaliar a melhor concentração celular em função do tempo. Foi observado, conforme apresentado na Figura 32, que a melhor concentração celular a ser utilizada nos ensaios de proliferação, para um período de cinco dias, estaria compreendida entre 4×10^3 e 8×10^3 células / mL.

Os ensaios de proliferação foram realizados utilizando a concentração celular inicial de 4×10^3 células / mL.

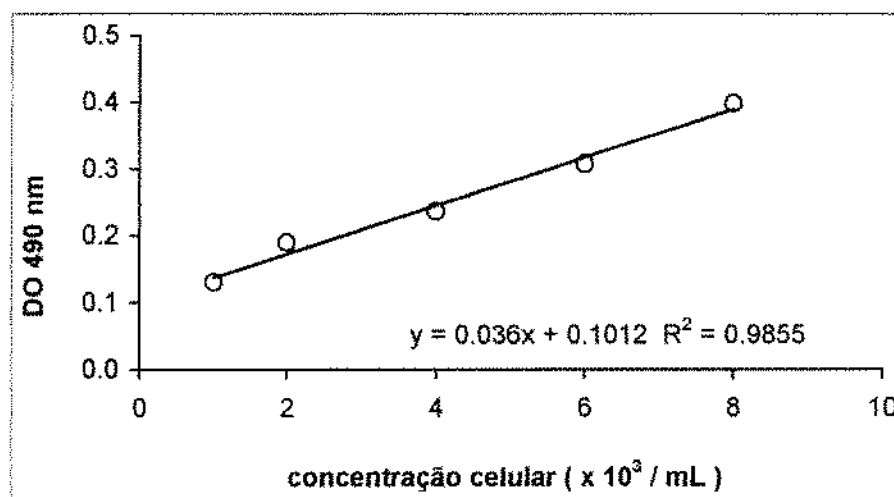


Figura 32 - Avaliação da linearidade do ensaio, após cultivo celular durante cinco dias.

Para avaliar se as lectinas exerciam efeito tóxico sobre as células, ensaio de viabilidade celular foi realizado. A Figura 33 apresenta a viabilidade celular dos fibroblastos, avaliada pelo ensaio colorimétrico com MTT. Os resultados demonstram que as lectinas não exerceram efeito tóxico sobre as células, nas concentrações de 0,1 a 20 $\mu\text{g/mL}$.

Os resultados foram apresentados considerando a viabilidade das células cultivadas na ausência das lectinas como sendo igual a 100% (viabilidade relativa).

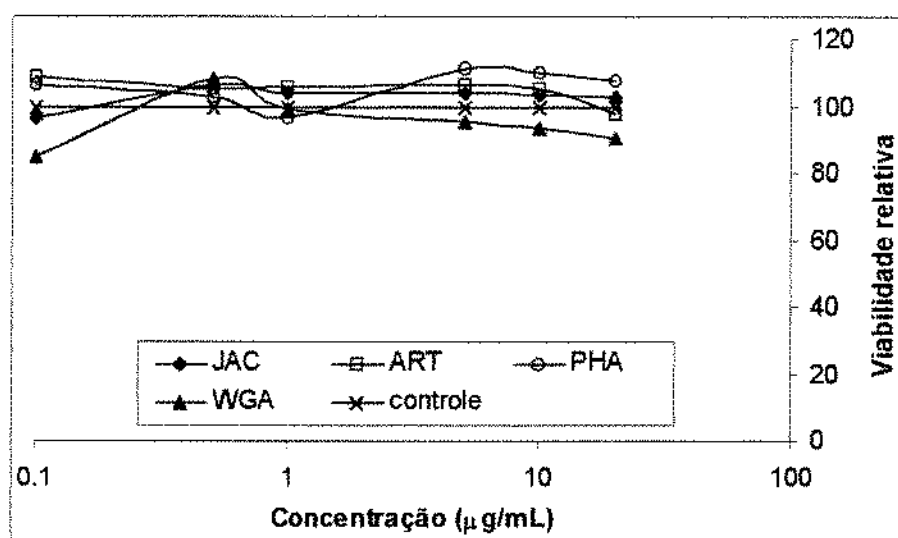


Figura 33 - Ensaio de toxicidade.

O efeito das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina, sobre a proliferação de fibroblastos humanos é descrito na Figura 34. A absorbância a 490 nm foi medida após a metabolização do MTT pelas células que proliferaram, na presença e na ausência das lectinas. As lectinas foram adicionadas ao meio nas concentrações entre 0,1 a 300 $\mu\text{g/mL}$.

As diferenças de densidade ótica entre os valores médios obtidos (controle menos tratado) foram mostradas na Figura 34 e foram avaliadas estatisticamente segundo o teste *t* de Student. Para cada lectina, as diferenças significativas ao nível de 5% foram destacadas no gráfico por meio de símbolos cheios. Para as demais,

foram usados símbolos sem preenchimento. As diferenças positivas máximas representam 100% de mortalidade celular.

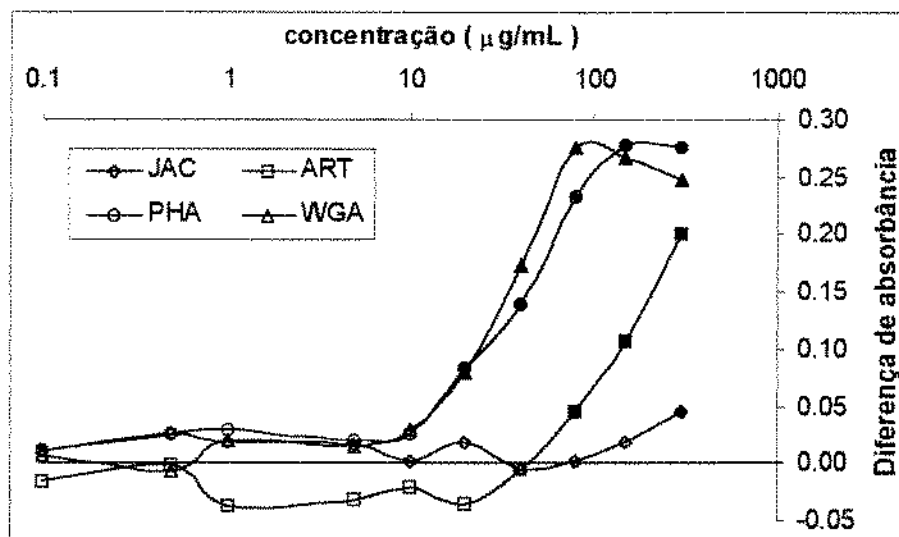


Figura 34 - Influência das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina na proliferação de fibroblastos. Símbolos cheios indicam diferença significativa a 5%.

As lectinas PHA e WGA promoveram, ambas, efeito significativo para concentrações de 20 $\mu\text{g/mL}$ ou maiores (Figura 34). A partir desta concentração começaram a ser observadas alterações no formato das células, à microscopia de inversão. Os fibroblastos tornaram-se arredondados, ficaram pouco aderentes à placa e foram removidos nos procedimentos de trocas dos meios. Também foi observado pequeno percentual de morte celular, o qual chega a 100% nas concentrações mais altas das lectinas (resultados não mostrados).

O efeito da jacalina foi significativo apenas para a concentração máxima (Figura 34).

A artocarpina promoveu aumento da proliferação celular quando empregada em concentração menor que 40 $\mu\text{g/mL}$ (valores negativos na Figura 34), embora as

diferenças não sejam estatisticamente significativas. Efeito significativo ocorreu apenas nas concentrações acima de 80 $\mu\text{g/mL}$, com redução na proliferação.

O efeito das lectinas sobre a adesão dos fibroblastos à placa de poliestireno é apresentado na Figura 35.

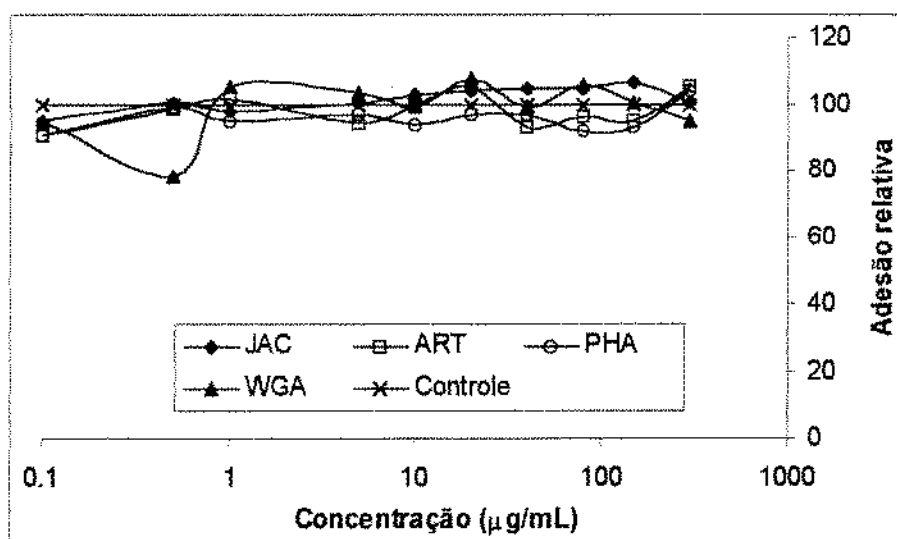


Figura 35 - Influência das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina na adesão de fibroblastos.

Foi observado que nenhuma das lectinas modificou, significativamente, a adesão dos fibroblastos à placa de poliestireno, nas concentrações entre 0,1 a 300 $\mu\text{g/mL}$. Os dados foram apresentados como adesão relativa, ou seja, o índice de adesão do grupo controle foi considerando como sendo igual a 100%.

IV - REPARAÇÃO

Para avaliar a influência das lectinas PHA, WGA e jacalina sobre a reparação tecidual, análises macroscópicas e microscópicas foram utilizadas. Como parâmetro macroscópico, os diâmetros das feridas foram medidos diariamente. A retração da

ferida foi comparada estatisticamente, entre os grupos teste e seus respectivos controles. As análises histológicas foram realizadas em cortes corados com a hematoxilina - eosina e após a impregnação com a prata.

IV.1 – Retração das feridas

Na Figura 36 está demonstrada a retração das feridas após a aplicação local de PHA. As médias foram comparadas através do teste *t* de Student e as diferenças significativas ao nível de 5% foram destacadas no gráfico por meio de símbolos cheios. Para as demais, foram usados símbolos sem preenchimento. Houve maior retração das feridas tratadas com a lectina, no período compreendido entre o décimo e o décimo terceiro dias após a excisão.

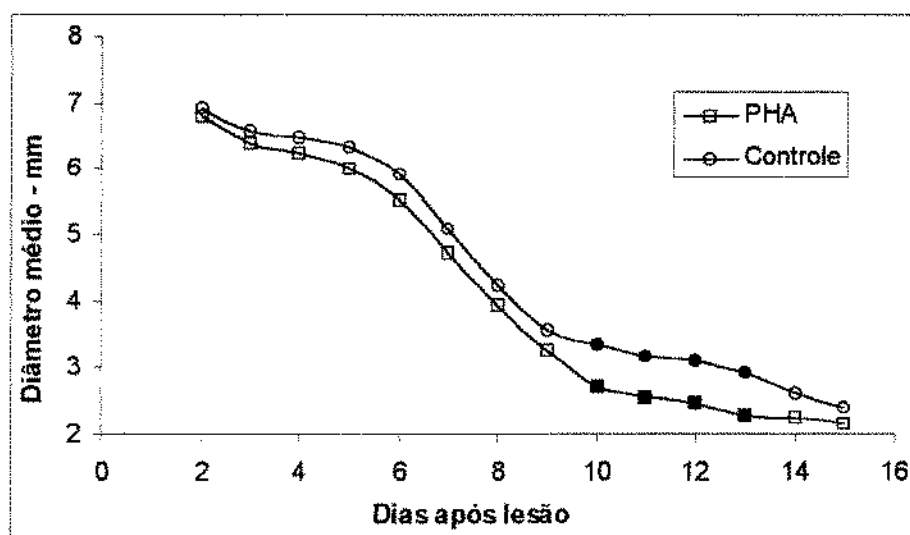


Figura 36 - Retração das feridas nas lesões tratadas com PHA.

A Figura 37 representa as medidas do diâmetro das feridas após a aplicação local de WGA. Nenhuma diferença significativa foi observada. As médias foram comparadas através do teste *t* de Student.

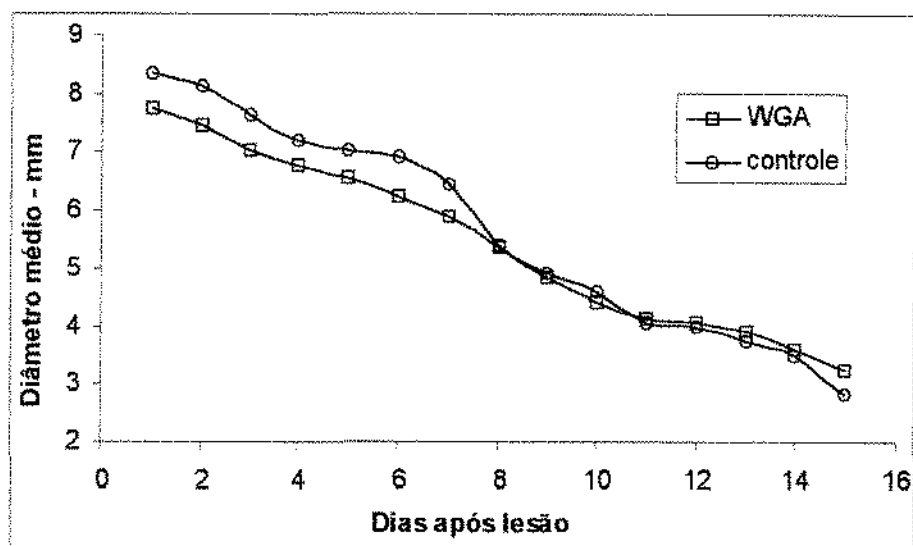


Figura 37 - Retração das feridas nas lesões tratadas com WGA.

Na Figura 38 está demonstrada a retração das feridas após a aplicação local da jacalina. Nenhuma diferença significativa foi observada. As medidas foram avaliadas através do teste *t* de Student.

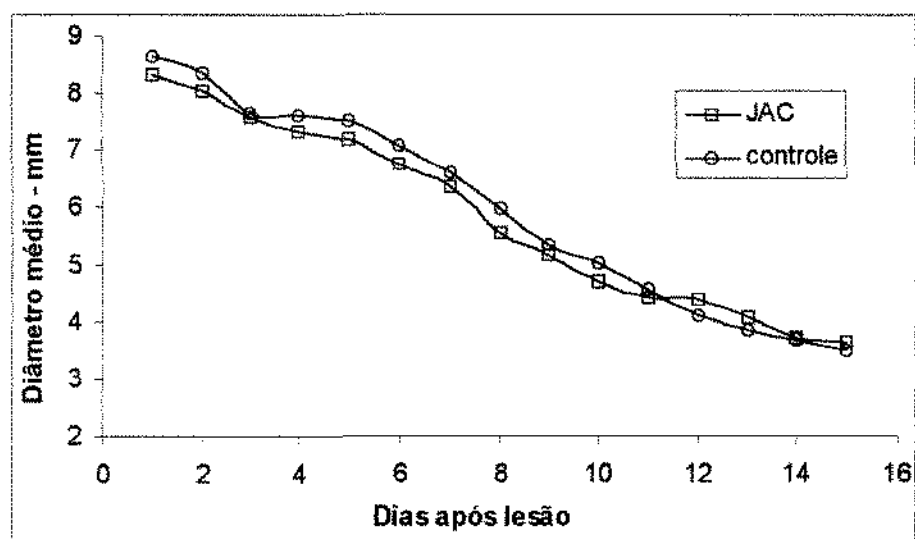


Figura 38 - Retração das feridas nas lesões tratadas com jacalina.

O aspecto macroscópico dos ferimentos, nos grupos tratados com PHA e WGA, são apresentados nas Figuras 31 a 42.

No período compreendido entre os dias 3, 7, 11 e 15 dias após a excisão, estão apresentados os aspectos dos ferimentos do grupo tratado com PHA e seu respectivo controle. No período de 11 e 15 dias, após a excisão, do grupo tratado com WGA e seu controle.

A retração mais rápida no grupo tratado com PHA e o atraso na reparação no grupo tratado com WGA ficam evidenciados.

Aspecto macroscópico dos ferimentos realizados nos grupos tratados com PHA e WGA.



Figura 39
Controle - 3º dia



Figura 40
PHA - 3º dia



Figura 41
Controle - 7º dia

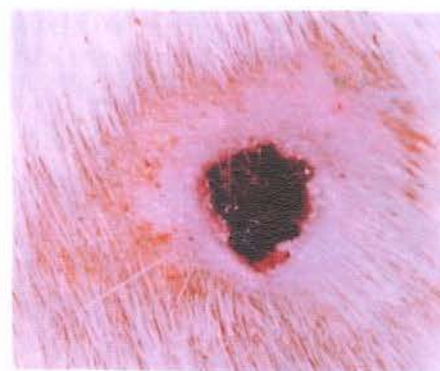


Figura 42
PHA - 7º dia

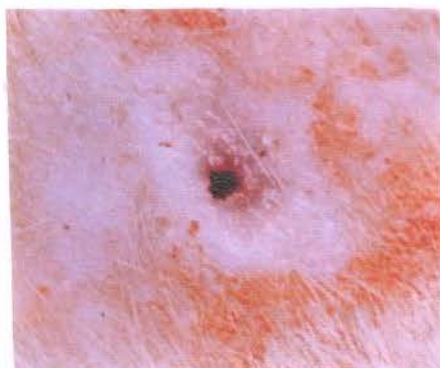


Figura 43
Controle - 11º dia

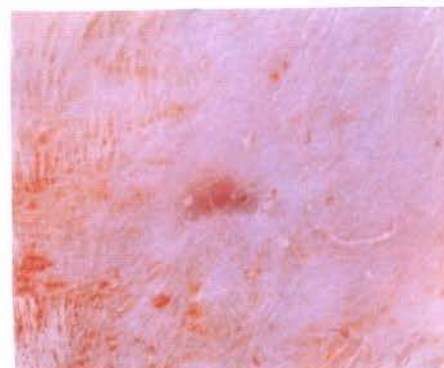


Figura 44
PHA - 11º dia



Figura 45
Controle - 15º dia



Figura 46
PHA - 15º dia



Figura 47
Controle - 11º dia



Figura 48
WGA - 11º dia



Figura 49
Controle - 15º dia

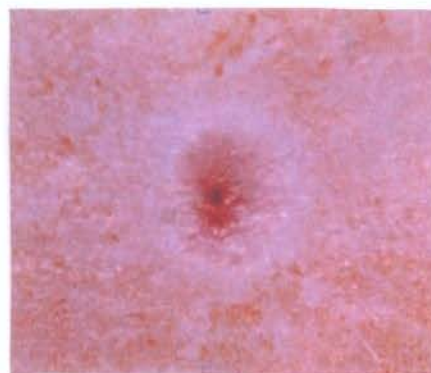


Figura 50
WGA - 15º dia

IV.2 - Análise histológica

IV.2.1 - Coloração pela hematoxilina - eosina (HE)

Na análise histológica utilizando a coloração com HE, avaliou-se a morfologia dos tecidos envolvidos no processo de reparação, como a formação do epitélio e do tecido conjuntivo neoformado, denominado tecido de granulação.

Período: Terceiro dia de reparação tecidual

Grupo controle

A área da ferida apresentou-se recoberta por uma camada de tecido necrótico. Subjacente a esta área, observou-se um infiltrado moderado de neutrófilos e, abaixo deste, a existência de um tecido desorganizado, pobre em fibras e com poucas células mononucleares e fibroblastos (Figura 51).

Grupos tratados com as lectinas

Nos ferimentos tratados pela PHA e pela jacalina, observamos aparência bem semelhante ao dos ferimentos controles. As áreas das feridas apresentaram-se recobertas por uma crosta, com tecido necrótico. Abaixo deste, foi observado infiltrado celular constituído predominantemente por neutrófilos. Nesta região também foram evidenciados vasos sangüíneos com hemáceas grumadas em seu interior. Poucos fibroblastos foram observados no tecido desorganizado que constituirá o tecido de granulação.

No grupo tratado com WGA o aspecto morfológico foi semelhante, porém maior infiltrado de células polimorfonucleares abaixo da crosta do tecido necrótico foi evidenciado (Figura 52).

Período: Sétimo dia de reparação tecidual**Grupo controle**

Neste período ainda observamos a presença da crosta. As células epiteliais migraram a partir das bordas das feridas em direção ao centro, porém não recobriram a ferida. O tecido de granulação apresentou padrão normal com grande quantidade de células, como fibroblastos e células mononucleares, assim como grande quantidade de vasos sanguíneos neoformados e funcionais (Figura 53).

Grupos tratados

Nos grupos tratados com PHA e jacalina, observamos a presença da crosta. O epitélio apresentou-se em proliferação, sem recobrir a ferida. O tecido de granulação mostrou-se mais fibroso, com menor número de células que o grupo controle correspondente, embora estivesse presente grande número de leucócitos mononucleares e de fibroblastos em atividade. Maior número de vasos sanguíneos neoformados foram observados (Figura 54).

No grupo tratado com WGA, a presença da crosta também pode ser observada, porém com uma camada maior de tecido necrótico. O tecido de granulação estava mais atrasado, apresentando-se com menor quantidade de fibras colágenas e de fibroblastos. As hemáceas formaram trombos dentro dos vasos (Figura 55).

Período: Décimo primeiro dia de reparação tecidual**Grupo controle:**

Neste período, a crosta necrótica ainda estava presente e discreto infiltrado de células polimorfonucleares foi observado. O epitélio avançou sobre a região da ferida mas não recobriu a região próxima a crosta. O tecido de granulação

apresentou-se mais fibroso, com fibroblastos em proliferação, linfócitos e vasos sanguíneos neoformados (Figura 56).

Grupos tratados:

No grupo tratado com a jacalina, o aspecto morfológico da ferida foi semelhante ao do controle.

No grupo tratado com a PHA, o epitélio encontrou-se totalmente formado, recobrendo toda a extensão da ferida, e não mais estava presente a crosta com tecido necrótico. O tecido de granulação esteve mais fibroso e menos celular que aquele do grupo controle correspondente. Os feixes de fibras de colágeno estiveram mais organizados, dispendo-se paralelamente a superfície (Figura 57).

No grupo tratado com WGA, a crosta com áreas necróticas ainda estava presente e o epitélio ainda não se formou. O tecido de granulação apresentou-se com menor grau de desenvolvimento e com menor quantidade de fibras colágenas, ou seja, menos fibroso e mais celular (Figura 58).

Período: Décimo quinto dia de reparação tecidual

Grupo controle

Neste período, o epitélio que recobre toda a área da ferida apresentou-se com padrão próximo a normalidade, com formação de queratina. O tecido de granulação apresentou-se mais fibroso que no período anterior, com feixes de fibras de colágeno bem evidentes. Menor número de vasos sanguíneos e poucos fibroblastos foram observados. Houve grande redução do tamanho da ferida (Figura 59).

Grupos tratados

Nos ferimentos tratados com PHA, o epitélio recobriu toda a ferida e encontrou-se queratinizado. O tecido subjacente apresentou-se mais fibrosado que o

do grupo controle correspondente. Houve evidências de formação de anexos da pele, o que denotou maior maturação do tecido (Figura 60).

No grupo tratado com WGA, o epitélio recobriu totalmente a ferida, porém era mais espesso que o do grupo controle, pois ainda estava em formação, e não estava queratinizado. O tecido abaixo estava sem necrose, porém próximo ao epitélio apresentou-se mais celular, indicando menor evolução no processo de reparação (Figura 61).

O grupo tratado com a jacalina, apresentou-se morfológicamente semelhante ao grupo controle correspondente.

IV.2.2 – Coloração argêntea

O grau de maturação do tecido de granulação, em relação à formação de feixes de fibras de colágeno, pode ser evidenciado sob luz polarizada, após impregnação dos cortes histológicos pela prata. Nestas circunstâncias, o colágeno brilha nas tonalidades alaranjada ou avermelhada, de acordo com o estágio de evolução do tecido.

Período: Terceiro dia de reparação tecidual

A Figura 62 representa o aspecto das feridas, no terceiro dia de reparação, tanto para os controles como para os tratados com as lectinas. Neste período, ocorreu pequena quantidade de colágeno. Os feixes eram finos e, portanto exibiam pouca birrefringência.

Período: Sétimo dia de reparação tecidual**Grupo controle**

A formação do tecido de granulação ficou evidente através do grau de birrefringência e da tonalidade de coloração apresentados. Os feixes de colágeno ainda delicados apresentavam birrefringência maior que no grupo anterior (Figura 63).

Grupos tratados

Nos grupos tratados com a jacalina e com PHA, observamos nítida diferença na coloração e no brilho exibidos pelos feixes de colágeno. A maior quantidade de feixes de colágeno foi evidenciada pelo maior brilho e pela tonalidade da cor alaranjada, observados nos cortes histológicos (Figura 64).

No grupo tratado com WGA, a intensidade de coloração foi menor que no grupo controle, evidenciando menor quantidade de fibras de colágeno (Figura 65).

Período: Décimo primeiro dia de reparação tecidual**Grupo controle**

Sob luz polarizada, os feixes de fibras de colágeno apresentaram-se compactados e exibiram birrefringência com intensidade superior ao do grupo anterior (Figura 66).

Grupos tratados

Nos grupos tratados com PHA e com a jacalina, o aspecto foi semelhante ao do grupo controle. Porém houve evidências de maior birrefringência no grupo tratado com PHA (Figuras 67 e 68).

No grupo tratado com WGA, a intensidade de coloração e brilho foi bem menor que a do grupo controle, no mesmo período, denotando menor amadurecimento do tecido (Figura 69).

Período: Décimo quinto dia de reparação tecidual

Grupo controle

Sob luz polarizada, os feixes de fibras de colágeno encontraram-se mais organizados. Tanto a birrefringência como a coloração alaranjada e avermelhada estiveram mais fortes e mais brilhantes que a do mesmo grupo, no período anterior. Porém, apresentaram-se menores que o da pele normal (Figura 70).

Grupos tratados

Maior quantidade de fibras de colágeno e maior organização foram observadas no grupo tratado com PHA. Através da birrefringência, brilho mais intenso e coloração mais avermelhada foram evidenciados (Figura 71).

No grupo tratado com WGA, observou-se nítido atraso na reparação. Menor quantidade de colágeno foi evidenciada por uma menor intensidade no brilho (Figura 72).

O aspecto histológico dos ferimentos do grupo tratado com a jacalina, apresentou-se com aspecto e birrefringência semelhantes ao dos ferimentos controle.

Reparação tecidual, em ferimentos tratados com as lectinas PHA e WGA. Coloração com hematoxilina – eosina. O aumento original das fotografias foi de $6,3 \times 1,25 \times 10$ ou, quando indicado, de $16 \times 1,25 \times 10$.

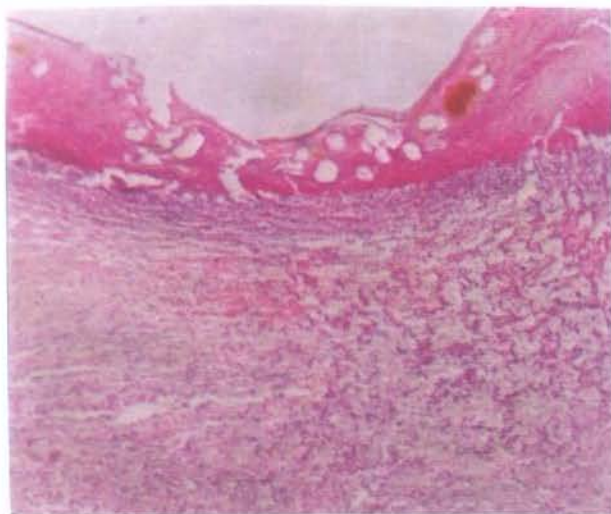


Figura 51
Controle – 3º dia

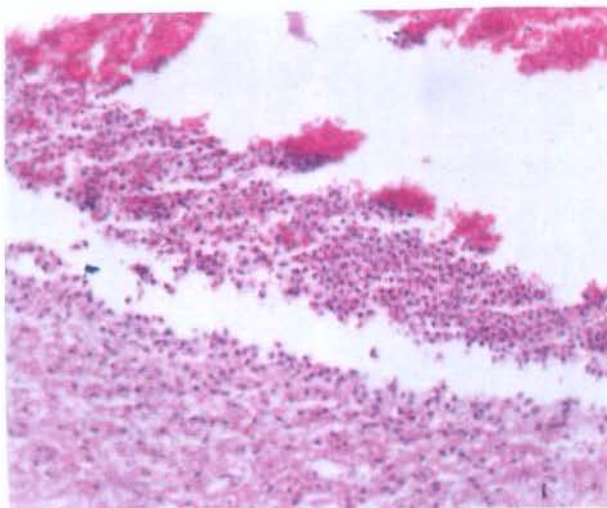


Figura 52
WGA – 3º dia
($16 \times 1,25 \times 10$)

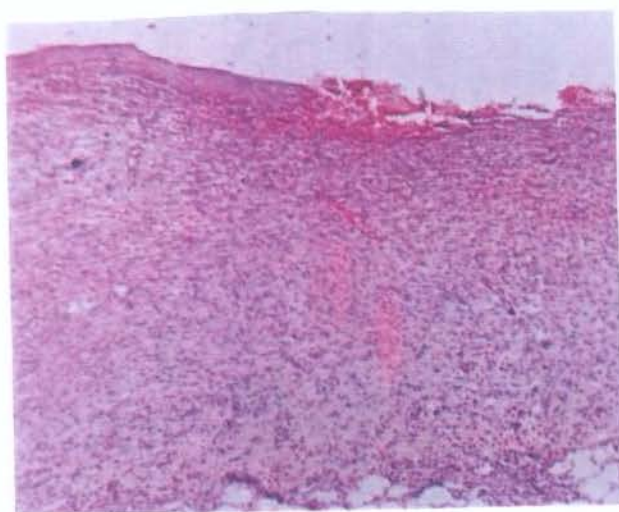


Figura 53
Controle 7º dia

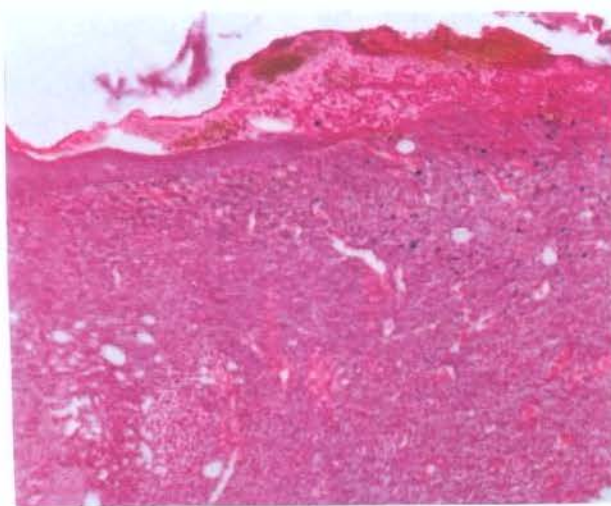


Figura 54
PHA – 7º dia

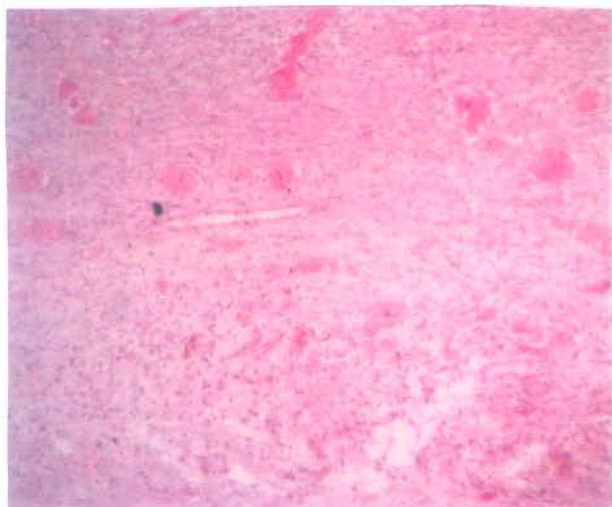


Figura 55
WGA – 7º dia

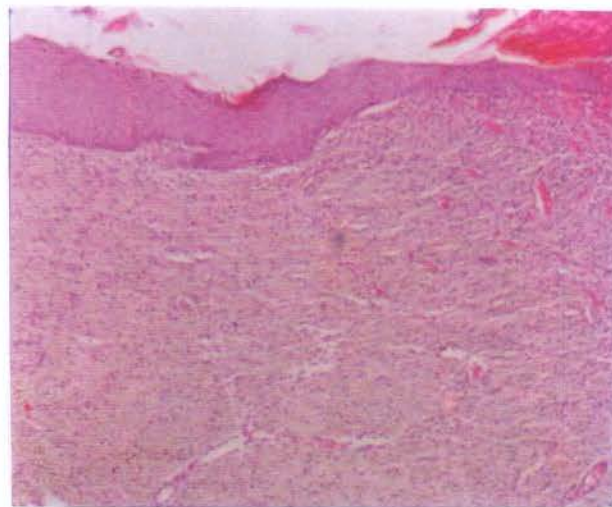


Figura 56
Controle – 11º dia

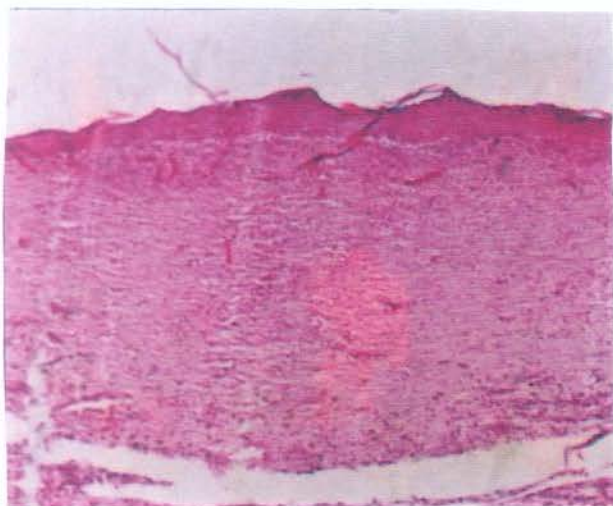


Figura 57
PHA – 11º dia

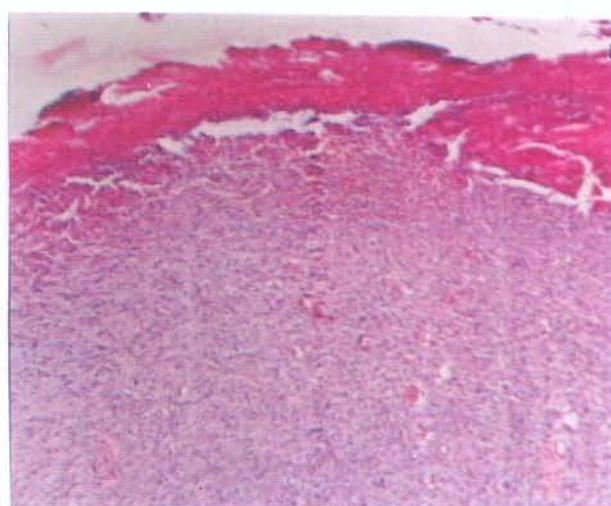


Figura 58
WGA – 11º dia



Figura 59
Controle – 15º dia

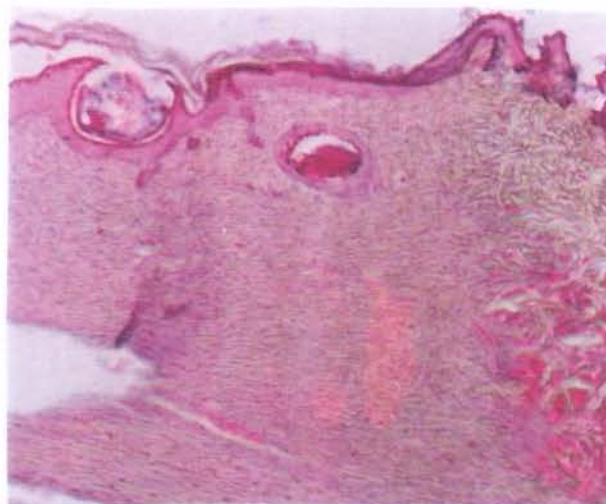


Figura 60
PHA – 15º dia

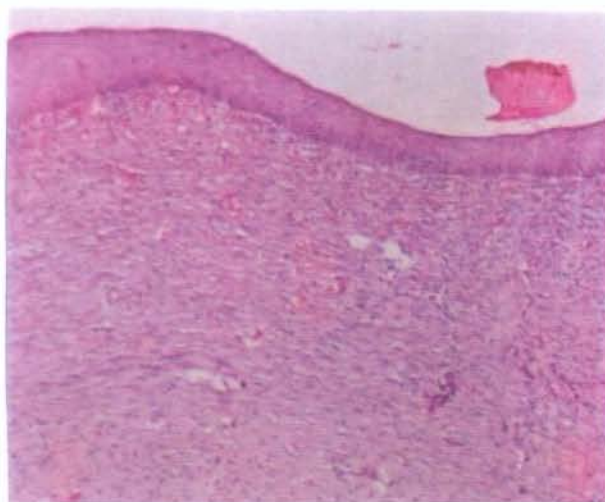


Figura 61
WGA – 15º dia

Reparação tecidual, em ferimentos tratados com as lectinas PHA, WGA e jacalina. Coloração argêntica. O aumento original das fotografias foi de 6,3 x 1,25 x 10.

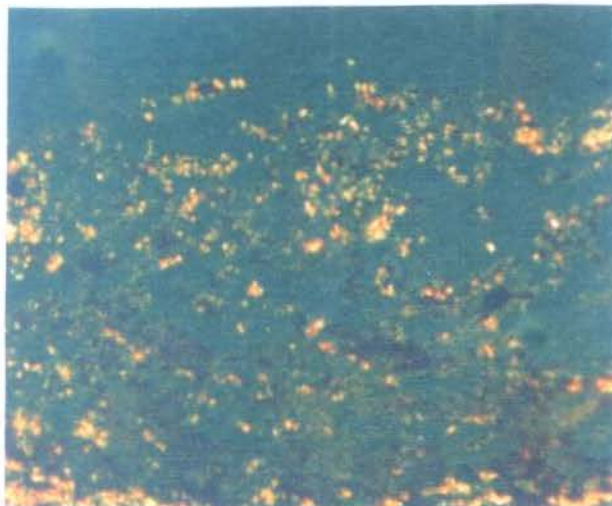


Figura 62
Controle – 3º dia

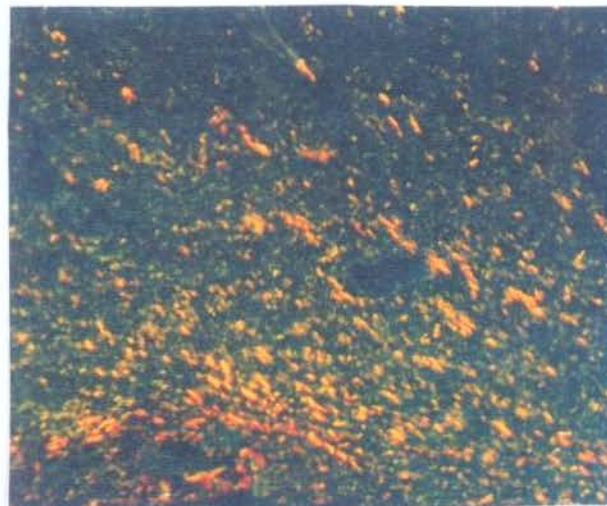


Figura 63
Controle – 7º dia

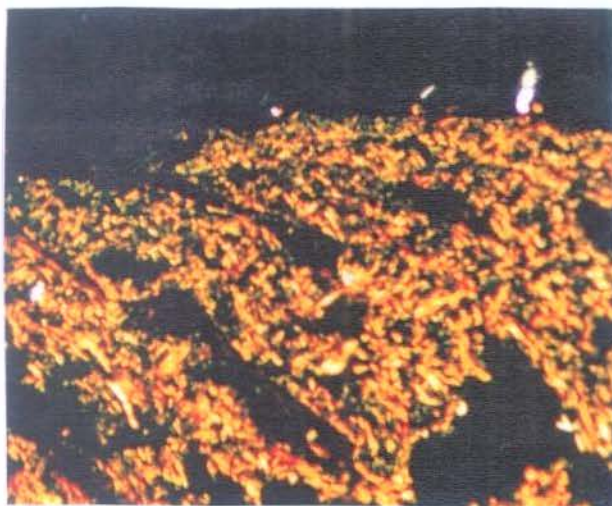


Figura 64
PHA – 7º dia

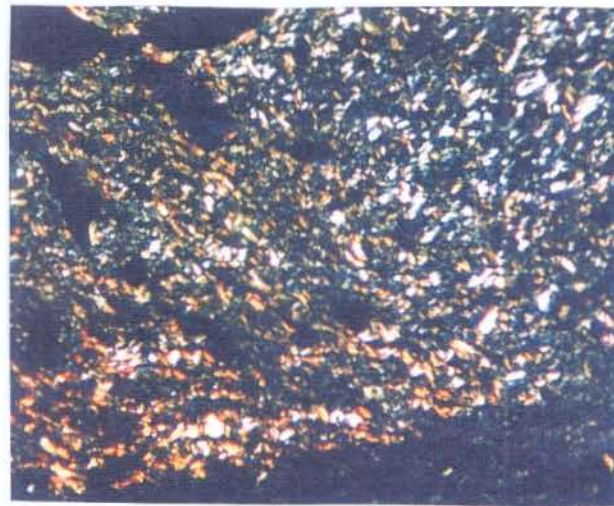


Figura 65
WGA – 7º dia



Figura 66
Controle - 11° dia

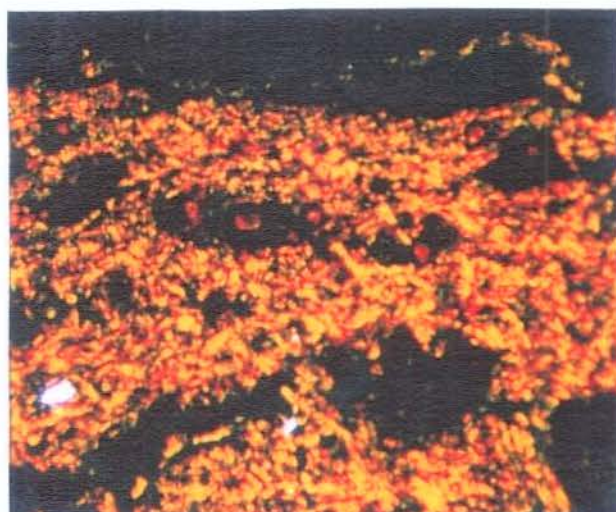


Figura 67
PHA- 11° dia

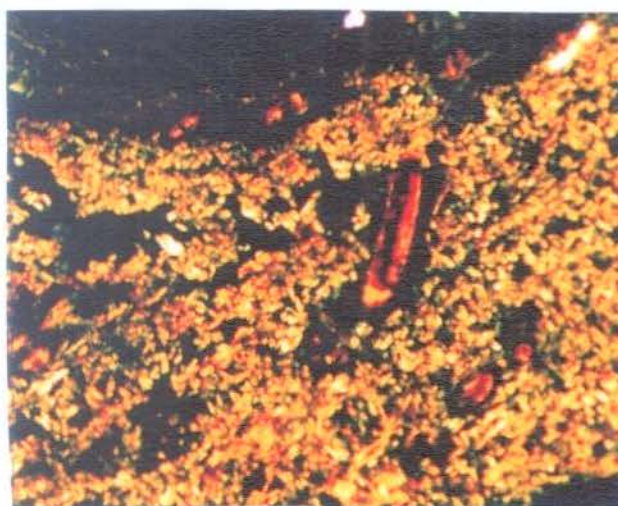


Figura 68
Jacalina - 11° dia

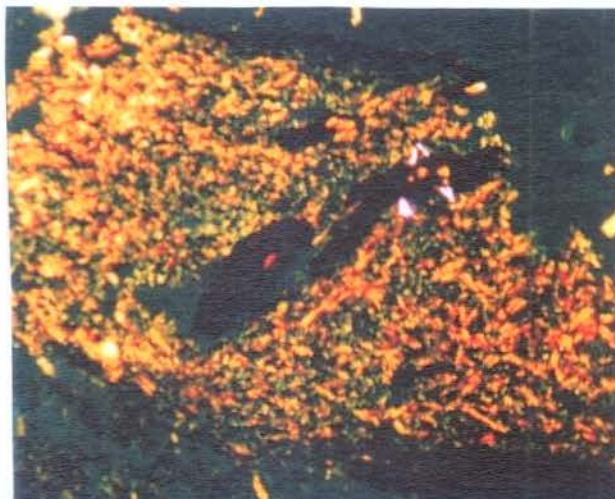


Figura 69
WGA - 11° dia



Figura 70
Controle – 15° dia

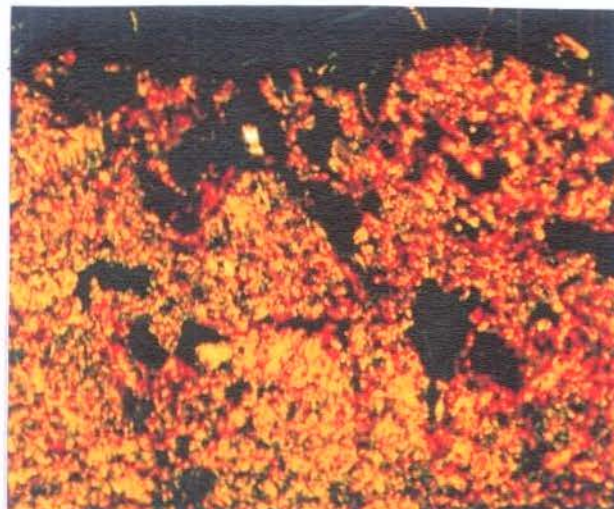


Figura 71
PHA – 15° dia

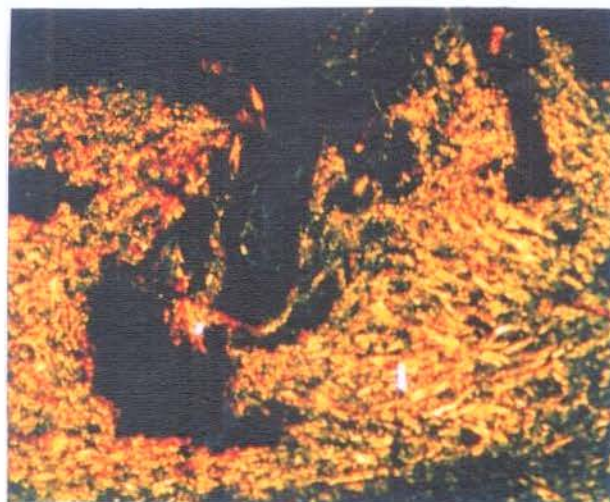


Figura 72
WGA – 15° dia

DISCUSSÃO

I - PURIFICAÇÃO

Na purificação das lectinas PHA e artocarpina foi usada a coluna de afinidade com matriz de ovomucóide. A matriz foi preparada conforme padronização proposta por GONÇALVES & COSTA (1995), porém com pequenas modificações na metodologia de purificação do ovomucóide, originalmente proposta por LINEWAVER & MURRAY (1947). A purificação foi avaliada através da eletroforese em gel de agarose apresentada na Figura 2. Foi constatada grande semelhança entre as proteínas obtidas em ambos os procedimentos, embora o rendimento de nossa preparação fosse, em média, vinte por cento menor.

Estas modificações apresentaram como vantagem a eliminação da etapa de diálise para remoção do ácido tricloroacético e a maior facilidade no processo de tornar a proteína insolúvel. Além disso, o fluxo da coluna permaneceu livre em todas as fases da purificação.

A coluna foi estável em todos os procedimentos de purificação e por um período superior a um ano, sem apresentar mudanças na sua capacidade, seletividade ou fluxo.

A fitohemaglutinina, PHA, foi obtida em grau de pureza adequado. O perfil de eluição, apresentado na Figura 3, demonstra que as proteínas foram eluídas em um pico simétrico característico das purificações em matriz de afinidade. A lectina

foi obtida em alta concentração, média de 3,0 mg/mL, nos primeiros 20 mL do eluente. A capacidade da coluna foi de 6,3 mg de proteína/mL de matriz, 10 a 25% menor do que a obtida por FREIRER et al. (1985) e GONÇALVES & COSTA (1994), respectivamente.

Na eletroforese em gel de poliacrilamida, em pH ácido, observamos a presença das cinco isolectinas e o grau de pureza adequado da PHA. Os valores das massas moleculares das isolectinas ficaram compreendidos entre aproximadamente 33 e 35,5 kDa, semelhante aos obtido por FREIER et al. (1985).

A atividade hemaglutinante específica foi de 221,171 e a concentração mínima de proteína necessária para aglutinar o *pool* de hemáceas humanas foi de 4,520 µg/mL. Estes valores são superiores aos obtidos por FREIER et al. (1985), cuja atividade específica foi de 128 e semelhantes a alguns cultivares nacionais de *P. vulgaris* analisados por CARVALHO (1981).

A jacalina foi purificada em matriz de afinidade agarose-D-galactose. O perfil de eluição, apresentado na Figura 5, é característico de uma purificação adequada em matriz de afinidade. A lectina purificada foi reunida em um pico simétrico. As frações que apresentaram absorbância a 280 nm superior a 1,0, foram reunidas nos 10 mL iniciais do eluente. Somente estas frações apresentaram atividade hemaglutinante.

Na eletroforese em gel de poliacrilamida, Figura 7, a pureza da lectina foi demonstrada. Pelo sistema SDS-PAGE foram reveladas as massas moleculares das frações α e β , cujos valores foram de 12,1 e 15,3 kDa. Estes valores estão em concordância com os obtidos por ROQUE-BARREIRA et al. (1986), YOUNG et al. (1991) e SANTOS de OLIVEIRA et al. (1994).

COSTA (1989) avaliou a jacalina quanto à sua capacidade de aglutinar hemáceas humanas. Observou que não havia especificidade de grupo e que a quantidade mínima de jacalina capaz de aglutinar eritrócitos humanos era de 0,195 µg/mL. Conforme apresentado na Tabela 1, a atividade hemaglutinante específica

para a jacalina purificada e utilizada nos experimentos deste trabalho foi de 5.637,9 e a quantidade mínima da lectina capaz de aglutinar foi de 0,177 $\mu\text{g/mL}$.

MIRANDA-SANTOS et al. (1991b) purificaram a outra lectina manose específica de *A. integrifolia* em resina de afinidade agarose-D-manose, e a denominaram de artocarpina, a qual foi incapaz de aglutinar eritrócitos humanos dos grupos A, B e O. Ao contrário, SANTOS de OLIVEIRA et al. (1994) denominaram a lectina manose específica, das sementes de jaca, de KM^+ e a identificaram como uma molécula tetramérica, que em SDS-PAGE apresenta-se como uma única banda com massa molecular de 13 kDa, capaz de aglutinar hemáceas humanas na concentração mínima de 25 $\mu\text{g/mL}$. COSTA (1989) havia observado que a outra lectina da semente de jaca apresentava baixo título hemaglutinante.

Em nosso experimento denominamos a lectina- manose específica da semente de jaca como artocarpina. A lectina foi purificada em coluna de ovomucóide, glicoproteína presente na clara de ovo recomendada por FREIER et al. (1986) como uma matriz apropriada para a purificação das lectinas de plantas. O perfil de eluição da lectina foi apresentado na Figura 4. Ao contrário de PHA e jacalina, o perfil não é característico de uma purificação adequada pois é acompanhado por uma cauda, mesmo em concentrações maiores de proteína. A análise eletroforética (Figura 7) demonstra que não houve contaminação com a jacalina e, pelo sistema SDS-PAGE, foi observada uma banda com massa molecular de 13,5, após aquecimento e na presença de agentes redutores. A atividade hemaglutinante específica foi de 41,450 e a concentração mínima de lectina com capacidade de aglutinação foi de 24,1 $\mu\text{g/mL}$.

II - EFEITO INFLAMATÓRIO

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

Procurando avaliar o possível efeito inflamatório induzido pelas lectinas PHA, WGA e jacalina, injeções intradérmicas foram realizadas no dorso de ratos da linhagem Wistar. As avaliações foram conduzidas por um período de sete dias. As análises histológicas foram realizadas em cortes corados pela hematoxilina – eosina no período compreendido entre 24, 48, 72 horas, 5 dias e 7 dias, após a administração das lectinas. As medidas do tamanho da pápula, formada no local da injeção, foram determinadas diariamente.

As concentrações foram definidas como aquelas que induziram inflamação e não provocaram necrose. As lectinas PHA e jacalina foram utilizadas nas concentrações de 25 μg ou $0,2 \times 10^{-6}$ M e $0,6 \times 10^{-6}$ M, respectivamente. WGA foi utilizada numa concentração quatro vezes maior, 100 μg , ou $2,7 \times 10^{-6}$ M. Nesta concentração observamos uma reação inicial semelhante a das outras duas lectinas, embora houvesse formação de necrose.

O padrão macroscópico de reação foi semelhante para as lectinas PHA e jacalina nestas concentrações. Quando a lectina PHA foi aplicada em doses maiores, um aumento da reação macroscópica ocorreu, proporcionalmente. No entanto, quando foi aplicada a jacalina em doses maiores, as medidas macroscópicas da reação inflamatória local revelaram pouca diferença.

Houve formação de pápula grande após vinte e quatro horas da injeção, diminuição nas próximas 72 horas e ligeiro aumento a partir daí, o qual permaneceu aproximadamente constante até o último dia. O aspecto macroscópico de evolução da inflamação não acompanhou o histológico. Nas primeiras 72 horas, foram inversamente proporcionais. A formação da pápula nas primeiras vinte e quatro horas e a posterior diminuição de seu tamanho, possivelmente está relacionada com o processo de agressão decorrente da injeção, uma vez que, neste mesmo período, também foi observada a formação de pápula nos animais controles. Após o quarto dia, o tamanho da pápula aumentou pouco ou permaneceu aproximadamente igual, enquanto o aspecto histológico da inflamação decresceu.

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

A análise histológica evidenciou uma reação inflamatória bem localizada e forte para as lectinas nas primeiras vinte e quatro horas. Houve predomínio de células mononucleares, principalmente linfócitos, na inflamação induzida por PHA e jacalina, porém na induzida por WGA, a proporção entre células inflamatórias mononucleares e polimorfonucleares foi semelhante. Após, este período foi evidente a diminuição da inflamação provocada por WGA. Para as lectinas PHA e jacalina, a reação inflamatória observada 48 horas após a injeção foi maior que no período anterior e a partir daí diminuiu com o tempo, embora fosse, em todos os períodos analisados, ligeiramente maior para PHA.

O efeito inflamatório das lectinas pode ser decorrente dos mecanismos de quimioatração. Atividade quimiotática para células mononucleares foram descritas para PHA (MODY et al., 1995) e para a jacalina (SAKAMOTO et al., 1995a; FELIPE et al., 1995).

A atividade inflamatória também pode ser devida à estimulação inespecífica de leucócitos. PHA e jacalina induziram reação inflamatória predominantemente mononuclear, enquanto o efeito inflamatório de WGA foi praticamente inexistente. De fato, PHA é um mitógeno clássico e a jacalina é estimuladora da subpopulação de linfócitos T CD4. Ao contrário, a lectina de germe de trigo somente ativa células B condições especiais, além de exercer efeito inibidor sobre o metabolismo dos linfócitos.

Além disso, a estimulação da produção de citocinas pelos leucócitos em cultura, quando ativadas com estas lectinas, foram documentadas. Células sanguíneas humanas cultivadas na presença de PHA secretam $\text{INF}\gamma$ e GM-CSF (VAN WAUNE et al., 1995). Jacalina estimula a produção de $\text{INF}\gamma$, em hibridomas de linfócitos T (CRANE et al., 1984) além de fatores de crescimento de linfócitos T

pelas células esplênicas de ratos (DALMAU et al., 1989). $\text{INF}\gamma$ é uma citocina ativadora de macrófagos. Os macrófagos quando ativados, adquirem diversas habilidades biológicas, tornam-se aptos a participarem de diversos mecanismos intermediários, importantes na reação inflamatória e no reparo.

O efeito inflamatório local induzido por outras lectinas foram abordados por outros autores BENJAMIN et al. (1997).

III - CULTURA

Desde o início da década de setenta, as lectinas vêm auxiliando na compreensão dos mecanismos de ligação dos diversos ligantes aos receptores de superfície de membrana plasmática e nas avaliações das respostas biológicas decorrentes (PORETZ et al., 1980; KAPLOWITZ, 1985). Estas moléculas possuem o potencial de mimetizar os efeitos de alguns peptídeos mitogênicos ou de antagonizar os efeitos de diversos fatores de crescimento, uma vez que interagem com os mesmos receptores (KAPLOWITZ, 1985).

As ligações das lectinas a receptores de membrana de fibroblastos foram evidenciados por diversos autores, os quais relataram que estas moléculas podem alterar a ação dos fatores de crescimento, inibindo a proliferação celular *in vitro*. A ativação da proliferação de fibroblastos em cultura, em níveis significativos, no entanto, não foi relatada.

Em 1977, CARPENTER & STANLEY, demonstraram que as lectinas que interagem com a manose (Con A), a galactose (ricina e abrina) e com a N-acetilglucosamina (WGA) bloqueiam a ligação de EGF marcado com ^{125}I à superfície de fibroblastos humanos, quando cultivados a 37°C e a 4°C. A inibição foi proporcional à concentração. Porém, as lectinas com especificidade a fucose ou a N-acetilgalactosamina não interferem na ação destes fatores de crescimento.

Paralelamente, demonstraram que a adição de Con A, na concentração de 1 a 30 $\mu\text{g/mL}$, não aumentou a síntese de DNA na presença ou ausência de EGF.

PORETZ et al. (1980) e St. JOHN et al. (1980) observaram que fibroblastos 3T3 de camundongos BALB/c, cultivados na presença da lectina WFA, acumulam em seu citoplasma grandes vacúolos lisossomiais, sem contudo alterar o crescimento ou o metabolismo celular. Quando adicionaram ao meio de cultura 200 $\mu\text{g/mL}$ de WFA por 48 horas, não observaram nenhuma alteração na razão de proliferação.

KAPLOWITZ (1985) avaliou o efeito de lectinas de plantas sobre os fibroblastos humanos, diretamente ou em combinação com vários fatores de crescimento. Observou que as lectinas WGA ou Con A não exerceram efeitos significativos sobre a incorporação basal de ^3H - timidina. Entretanto, ambas as lectinas, nas concentrações de 5 a 20 $\mu\text{g/mL}$, diminuíram a síntese de DNA após estimulação com insulina ou EGF. Este efeito está relacionado, provavelmente, com as alterações na mobilidade e na agregação do mitógeno ao receptor da membrana citoplasmática. Também pode estar relacionada com as alterações no formato das células, o que impede ou altera a interação com os fatores de crescimento (KAPLOWITZ & HAAR, 1988).

KAPLOWITZ & HAAR (1988) também observaram que PHA, na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$, inibiu a síntese de DNA pelos fibroblastos estimulados com EGF. Paralelamente, ocorreu um aumento em cerca de 75% dos receptores de superfície celular específicos a este peptídeo. Ao contrário, as lectinas de soja, amendoim, batata, *Phaseolus limensis* e de *Bandeirea simplicifolia*, nas concentrações de 10-50 $\mu\text{g/mL}$, não inibiram a ligação de EGF, não influenciaram na sua atividade e não modificaram o formato das células.

Estes autores relataram ainda que WGA, nas concentrações de 3-5 $\mu\text{g/mL}$ e incubada com os fibroblastos por vinte horas, alterou o formato celular, porém as células não se destacaram das placas. Este efeito foi mais evidente em concentrações maiores (10 $\mu\text{g/mL}$). A incubação de WGA com os fibroblastos diminuíram o

espraiamento das células e a síntese de DNA. Alterações no formato das células também foram observados quando os fibroblastos foram cultivados com as lectinas Con A (10 - 20 $\mu\text{g/mL}$) e PHA (25 - 50 $\mu\text{g/mL}$).

WEISER & OESCH (1988) estudaram a influência de diferentes lectinas sobre a proliferação de fibroblastos *in vitro*. As lectinas foram diluídas em meio DMEM acrescido de soro bovino fetal a 10%, nas concentrações de 1, 2, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$. Demonstraram que a adição de lectina galactose-dependente (lectina de *Bandeiraea simplicifolia* - BSI) resultou no aumento da incorporação de timidina tritiada. Este aumento foi dependente da concentração da lectina, embora não proporcionalmente, e da densidade de saturação celular. A lectina de *Ulex europeus* não influenciou na proliferação. Con A e WGA inibiram a proliferação celular. Os autores atribuíram o feito da lectina BSI, ao fato de que resíduos de galactose terminal, presentes nas glicoproteínas de membrana plasmática, foram essenciais ao crescimento celular. A lectina ao ligar-se ao açúcar específico, interfere no fenômeno de inibição por contato.

ASAGA & YOSHIZATO (1992) cultivaram fibroblastos em gel de colágeno na presença de diversas lectinas, nas concentrações de 10, 20 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Demonstraram que PHA, Con A e WGA, entre outras, modificaram a interação dos fibroblastos de pele humana com o colágeno, inibindo o processo de contração das fibras de colágeno, em cultura. Quando ocorreu a inibição da retração das fibras de colágeno, os fibroblastos cultivados na presença das lectinas permaneceram com formato arredondado.

Segundo estes mesmos autores, as lectinas de PHA e WGA interagem com os receptores da família das integrinas, presentes na superfície dos fibroblastos, os quais interagem com o colágeno. Além da interação com os receptores de membrana específicos a fibronectina, WGA também se liga a outros receptores, uma vez que interfere no espraiamento das células, tanto na superfície de colágeno como na superfície de plástico.

Neste trabalho, avaliamos a ação das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina, na proliferação de fibroblastos *in vitro*.

Os fibroblastos foram sub-cultivados até a décima quarta passagem. As concentrações das suspensões celulares foram previamente determinadas como 4×10^3 células/mL.

As lectinas foram utilizadas nas concentrações de 0,1 a 300 $\mu\text{g/mL}$. As concentrações médias usadas por outros autores ficaram compreendidas nesta faixa (KAPLOWITZ & HAAR, 1988; WEISER & OESH, 1988; ASAGA & YOSHIZATO, 1992).

Não foram observados efeitos tóxicos das lectinas sobre os fibroblastos. O cultivo destas células na presença das lectinas, por vinte e quatro horas, não modificou a viabilidade celular (Figura 33). O mesmo foi relatado por ASAGA & YOSHIZATO (1992) que, em seus experimentos, observaram que a viabilidade celular não era afetada, mesmo quando 100 $\mu\text{g/mL}$ de WGA e PHA foram adicionados.

Para revelar o grau de proliferação dos fibroblastos foi utilizado o ensaio colorimétrico com o MTT, devido à sua sensibilidade, precisão e por não necessitar do uso de substâncias radioativas (MOSMANN, 1983). GIENI et al. (1995) compararam o ensaio colorimétrico usando o MTT, com o uso de MTS e com o ensaio de incorporação de timidina tritiada. Observaram que o ensaio colorimétrico foi mais sensível. DALMAU et al. (1993) recomendaram o uso deste método, por apresentarem resultados compatíveis com o de incorporação de ^3H - timidina.

Adaptando às nossas condições laboratoriais, a determinação colorimétrica foi realizada em um comprimento de onda de 490 nm. Conforme apresentado na figura 31, as avaliações realizadas neste comprimento de onda, demonstraram que a técnica se mantém linear e sensível, sendo útil na detecção da proliferação e da adesão celular.

O uso de outros métodos que permitissem identificar o grau de divisão celular seria interessante para a comparação da sensibilidade. Por este método, as células

que estão com morfologia alterada e que não se multiplicam, pois a sua capacidade de aderência ao substrato está comprometida, mas que são viáveis e, portanto, são capazes de metabolizar o substrato, poderiam ser detectadas.

O efeito de PHA nos experimentos de proliferação foi apresentado na Figura 34. Para as concentrações de 0,1 a 10 $\mu\text{g/mL}$ não foram observadas influências significativas sobre a proliferação celular, porém acima de 20 $\mu\text{g/mL}$ houve grande redução da proliferação. Quando a lectina foi utilizada nas concentrações de 150 e 300 $\mu\text{g/mL}$, morte de todas as células foram observadas. Para nenhuma das concentrações utilizadas houve influência na adesão dos fibroblastos.

As reduções nos índices de proliferação foram associadas as modificações nos formatos das células, o que pode ser observado em microscópio de inversão. Quando a lectina foi adicionada na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$, 50% das células apresentaram-se com formas arredondadas. Nas concentrações de 80 $\mu\text{g/mL}$ de lectina, após 24 horas em cultura, observamos que 40% das células tinham formato alterado e para as concentrações de 150 e 300 $\mu\text{g/mL}$, quase todas as células estavam com formas arredondadas. A partir de 48 horas da adição da lectina no meio de cultura, 100% das células adquiriram formas arredondadas.

KAPLOWITZ & HAAR (1988) observaram mudanças no formato de fibroblastos quando cultivados com PHA nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. ASAGA & YOSHIZATO (1992) observaram que fibroblastos cultivados na presença da fitohemaglutinina, em gel tridimensional de colágeno, mantinham o formato arredondado. Além disso, a espraio das células foi modificado sobre a superfície de colágeno, o que não ocorreu sobre a superfície de plástico. As mudanças no formato das células podem alterar as interações entre os receptores dos fatores de crescimento e os componentes citoplasmáticos, necessários à sinalização transmembrana. Em nosso experimento observamos mudanças no espraio dos fibroblastos, quando cultivados na presença de PHA e WGA.

A lectina WGA provocou maior redução na proliferação dos fibroblastos, comparativamente a outras lectinas (Figura 34). Esta redução foi maior a partir de 10 $\mu\text{g/mL}$ e aproximou-se de 100% de redução a partir da concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$. Semelhante a PHA a inibição da proliferação foi acompanhada de alterações no formato das células. Muitas dessas células, ao se tornarem arredondadas, diminuíram a sua adesão na superfície da placa e se desprenderam durante as trocas do meio de cultura. As modificações no formato celular foram observadas nas concentrações de 20 $\mu\text{g/mL}$, mas somente após 72 horas de adição da lectina. Na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ foram observadas mudanças no formato de metade das células, após 24 e 48 horas, e em aproximadamente 80% das células após 72 horas. Nas concentrações de 80 a 300 $\mu\text{g/mL}$, cerca de 100% das células foram alteradas, após 24 horas.

Os nossos resultados estão em concordância com as observações de alguns pesquisadores. KAPLOWITZ (1985) avaliou o efeito de WGA sobre fibroblastos humanos e observou que a lectina não exercia efeitos significativos sobre a incorporação basal de ^3H - timidina. WEISER & OESCH (1988) porém, observaram que a adição de WGA no meio de cultura, nas concentrações de 1,0 a 20 $\mu\text{g/mL}$, reduziu, significativamente, a proliferação de fibroblastos intestinais humanos, medido através da síntese de DNA. Na mesma época, KAPLOWITZ & HAAR (1988) relataram que WGA nas concentrações de 3-5 $\mu\text{g/mL}$, incubadas com fibroblastos por vinte horas, alteraram o formato celular e demonstraram, em microscopia eletrônica, menor superfície de contato, embora as células não se destaquem das placas. Este efeito foi mais evidente em concentrações maiores (10 $\mu\text{g/mL}$). ASAGA & YOSHIZATO (1992) relataram que a introdução de WGA ao meio de cultura alterou o formato dos fibroblastos, cultivados em gel tridimensional de colágeno. Foi constatado que esta lectina alterou o espraçamento dos fibroblastos sobre a superfície de colágeno e sobre a superfície de plástico.

A introdução da jacalina ao meio de cultura, nas diferentes concentrações, não alterou a proliferação ou o formato das células. A lectina também não influenciou a adesão dos fibroblastos à placa.

Segundo WEISER & OESCH (1988), fibroblastos humanos cultivados na presença de lectinas específicas aos resíduos de galactose, aumentam a proliferação celular e a densidade de saturação. Em nosso trabalho, a lectina galactose específica, jacalina, não influenciou a proliferação celular (Figura 34) ou a adesão dos fibroblastos (Figura 35).

A diferença entre o nosso experimento e o de WEISER & OESCH (1988) pode estar relacionado ao fato de que diferentes lectinas, com a mesma especificidade, após ligarem nos açúcares específicos, induzem mudanças estereoquímicas diversas e, conseqüentemente, diferentes efeitos biológicos. Além disso, a jacalina é capaz de reagir com várias glicoproteínas do soro (COSTA, 1989; DALMAU et al. 1989). Ao trabalharmos com o meio de cultura suplementado com soro bovino fetal, muitos dos fatores de crescimento podem reagir com a lectina. Desta forma, nem os fatores de crescimento, nem a lectina, estariam disponíveis para interagirem com os receptores de membrana dos fibroblastos.

Não trabalhamos com densidade celular alta. Estes autores demonstraram que a regulação do crescimento de fibroblastos foi dependente da presença de galactose nas glicoproteínas da membrana plasmática, a *contactinibin*, responsável pela restrição de crescimento celular por inibição por contato (WEISER et al., 1995).

A artocarpina possui especificidade aos resíduos de manose e, em nosso experimento, foi a única lectina que aumentou ligeiramente a proliferação de fibroblastos, quando nas concentrações de 1 a 20 µg/mL. Embora não significativo estatisticamente, foi possível observar, em microscópio de inversão, que nas primeiras vinte e quatro a quarenta e oito horas, após a introdução da lectina, havia uma maior concentração de células em comparação ao controle. A partir da concentração de 80 µg/mL, após 48 horas, a lectina induziu a alteração no formato e

a morte celular, proporcionais ao tempo e a concentração da lectina (Figura 34). Esta lectina não influenciou na adesão das células à placa de cultura (Figura 35).

Con A possui especificidade aos resíduos de manose. CARPENTER & COHEN (1977) relataram que esta lectina não aumentou a síntese de DNA. Quando Con A foi introduzida em meio de cultura com alta densidade celular, houve inibição da proliferação dos fibroblastos (WEISER & OESCH, 1988).

IV - REPARO

A reparação é caracterizada por diversos eventos celulares e humorais que ocorrem de forma integrada, simultânea e sequencialmente. Inicia-se com a injúria tecidual, é mediada pela inflamação e finalizada após completa reepitelização.

Após a lesão, diversos eventos são ativados contribuindo para o restabelecimento da função do tecido ou órgão lesado. Processos exsudativos e diapedese de elementos celulares ocorrem imediatamente após o estímulo lesivo. Células fagocitárias mononucleares atuam na eliminação dos produtos de necrose e na síntese e secreção de fatores solúveis, eventos centrais no processo de reparação (WAHL et al., 1989). Estes fatores promovem o recrutamento, a proliferação e a ativação de fibroblastos e de células endoteliais. Os fibroblastos quando ativados, aumentam a síntese e a secreção de proteínas constituintes da matriz extracelular. IL-1, TNF e TGF β regulam a síntese de colágeno, das proteoglicanas e das glicoproteínas (WAHL et al., 1989).

Estudos *in vivo* demonstram uma completa interação entre os diversos fatores humorais e celulares. Dentre estes, incluem-se os fatores de crescimento, as citocinas, as moléculas de superfície celular e os componentes da matriz extracelular (WAHL et al., 1989).

As lectinas são proteínas que possuem diversas atividades biológicas, devido a sua capacidade de ligação aos carboidratos de superfície celular ou solúveis.

Dentre as diversas atividades biológicas, muitas poderiam contribuir ou promover a reparação. A resposta inflamatória local, a quimioatração de leucócitos, a ativação policlonal de linfócitos e a produção e secreção de fatores solúveis pelas células mononucleares, potencialmente contribuem para este processo.

As lectinas podem substituir os ligantes naturais e ativar as células, através dos diferentes caminhos de sinalização intracelular ou após a internalização do complexo formado (PORETZ et al., 1980). A ligação das lectinas à membrana celular pode induzir diversos efeitos, como a atividade mitogênica de linfócitos. PHA é um mitógeno clássico e a estimulação ocorre sobre os linfócitos T e B (BUNN-MORENO & CAMPOS NETO, 1981). A jacalina é estimuladora da subpopulação de linfócitos T CD4 (PINEAU et al., 1990; PREUD'HOMME et al., 1992). Ao contrário, a lectina de germe de trigo somente ativa as células B humanas, dependendo da concentração e do tempo de reação. Também exerce efeito inibidor sobre o metabolismo dos linfócitos (GREENE et al., 1981).

As interações entre os leucócitos e o endotélio vascular, assim como os seus movimentos na matriz extracelular, envolvem a participação das lectinas endógenas. Algumas lectinas de plantas possuem atividade quimiotática sobre leucócitos. A atividade quimiotática para células mononucleares foi descrita para PHA (MODY et al., 1995). A jacalina exerce quimioatração sobre polimorfonucleares, em camundongos Balb/c e CBA mas não em ratos (SAKAMOTO et al., 1995a). Em camundongos suíços, FELIPE et al. (1995) demonstraram que a jacalina aumenta as células fagocitárias, principalmente macrófagos, em número e atividade, dependente da liberação de citocinas de células T, provavelmente $INF\gamma$.

A estimulação da síntese e secreção de citocinas pelas células ativadas com lectinas foram documentadas. Muitas citocinas sintetizadas por leucócitos ativados, como IL-3, $TNF\alpha$, PDGF e $TGF\beta$, induzem a proliferação de fibroblastos e a deposição de colágeno, direta ou indiretamente (KOVAKS et al., 1993). Linfomas de células B secretam níveis altos de IL-2, quando estimulados com PHA (GILLIS et al., 1980). Células de sangue humano cultivadas na presença de PHA secretam

diversas citocinas, como IL-2, IL-5, GM-CSF e INF γ , importantes no processo inflamatório crônico e de reparo (VAN WAUNE et al., 1995). A jacalina induz a produção de INF γ pelos linfócitos humanos (CRANE et al., 1984) e de fatores de crescimento de células T pelas células esplênicas de ratos (DALMAU et al., 1989).

Devido às diversas habilidades funcionais de PHA, WGA e da jacalina, avaliamos a possibilidade de algumas destas lectinas influenciarem na reparação. Como estas moléculas apresentam especificidade e atividades biológicas distintas, a possibilidade de influenciarem no processo de reparação, através de sua inibição ou ativação foi estudada.

Em cada animal foram realizados quatro ferimentos. Três deles foram tratados com as lectinas e um, aleatoriamente escolhido, foi tratado com solução salina estéril constituindo o grupo controle. O tratamento com a lectina e o controle foram realizados no mesmo animal, para que as diferenças individuais fossem minimizadas ou evitadas, uma vez que os animais utilizados não são isogênicos.

Cada tratamento com uma das lectinas foi comparado aos controles realizados dentro do mesmo grupo. Desta forma, poderíamos evitar possíveis efeitos sistêmicos de uma lectina em comparação à outra. BENJAMIN et al. (1997) observaram efeitos antagônicos para a aglutinina de soja. Quando administrada localmente, a lectina exerceu efeito inflamatório e, a nível sistêmico, exerceu efeito antiinflamatório.

Os ferimentos foram circulares e, tanto a profundidade quanto o tamanho, foram padronizados. Segundo revisão realizada por REED & CLARCK (1985) o formato circular é recomendado pois, dentro das formas geométricas, o círculo é a que sofre menor expansão.

A tricotomia e a anti-sepsia foram realizadas imediatamente antes da excisão, procurando diminuir a contaminação bacteriana. Do total de ferimentos realizados, menos de 1% desenvolveram infecção.

As análises histológicas revelaram que PHA acelerou o processo de reparação tecidual na pele de ratos Wistar. WGA, ao contrário, retardou a reparação e a jacalina não influenciou o processo.

A análise macroscópica foi realizada através da medida da retração das feridas. Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos tratados com as lectinas e seus controles respectivos, exceto para PHA, no período entre o décimo e décimo terceiro dias. Este procedimento não mostrou relação com o resultado da análise histológica. Além disso, a formação da crosta sobre as feridas dificultou a realização das medidas dos diâmetros dos ferimentos em reparação.

Nos ferimentos tratados com PHA, ocorreu maior retração das feridas, estatisticamente significativa ao nível de 5%, entre o décimo e décimo terceiro dias após a excisão. O aumento das estruturas importantes ao processo de reparação foi evidenciado nas análises histológicas. O tecido de granulação apresentou-se gradativamente mais fibroso, os feixes de fibras de colágeno foram depositados e organizados mais rapidamente e a reepitelização e a formação dos anexos da pele ocorreram mais precocemente.

Potencialmente, PHA pode exercer importantes efeitos terapêuticos devido à sua habilidade de modificar ou influenciar nas diversas atividades biológicas. Dentre as habilidades atribuídas a esta lectina destacam-se a atividade mitogênica sobre linfócitos, a produção de citocinas endógenas e a atração de células mononucleares ao local de aplicação, que podem ter efeitos importantes em diversas etapas da reparação. Esta lectina também estimula a mielopoiese, reforça a resposta imune em várias infecções, e funciona como adjuvante, sem que tenha efeito sensibilizante (MODY et al., 1995).

Dentre as possíveis explicações para o fato de PHA acelerar o reparo da pele de ratos, quando aplicado localmente, incluem:

(i) a lectina exerceria efeito quimiotático sobre as células mononucleares (MODY et al., 1995);

LAWMAN et al. (1985) e BOYLE et al. (1985) sugeriram que a aplicação de fatores quimiotáticos nos ferimentos aceleram o processo de reparo e aumentam a retração das feridas. Estes autores relacionaram a habilidade de NGF (fator de

crescimento neural) em acelerar a reparação, à sua atividade quimiotóxica sobre as células inflamatórias.

(ii) o efeito inflamatório local, predominantemente mediado por células mononucleares seria benéfico. Os linfócitos e os monócitos ativados podem secretar fatores de crescimento e citocinas que participam na reparação, como FAF, IL-1, $\text{TNF}\alpha$, $\text{INF}\gamma$, $\text{TGF}\beta$.

Segundo WAHL et al. (1989), linfócitos T ativados sintetizam e secretam linfocinas que regulam o crescimento de fibroblastos. Entre estas citocinas, $\text{TNF}\alpha$ e $\text{TNF}\beta$ ou linfotoxina, indistintamente, regulam o crescimento de células mesenquimais e a habilidade de produção de componentes da matriz. $\text{INF}\gamma$ influencia diretamente a reparação, pois estimula o crescimento de fibroblastos e indiretamente, como potente regulador da proliferação e diferenciação de monócitos e macrófagos. Também ativam a transcrição de TNF e IL-1, citocinas com função quimiotóxica. Os FAFs são produtos de síntese de linfócitos T ativados por mitógenos, capazes de estimular a proliferação de fibroblastos em condições livres de soro. Os fibroblastos ativados aumentam a síntese de proteínas da matriz do tecido conjuntivo. TNF, IL-1 e $\text{TGF}\beta$ regulam a síntese de colágeno, proteoglicanas e glicoproteínas, como fibronectina, laminina e condronectina.

DOHMAN et al. (1985) caracterizaram, no sobrenadante da cultura de leucócitos estimulados com PHA, proteínas e peptídeos com funções ativadoras de fibroblastos. KOVACS et al. (1993) demonstraram que leucócitos periféricos, estimulados com IL-2, são capazes de induzir a proliferação de fibroblastos e a produção de tecido conjuntivo. O aumento da expressão dos genes que codificam para $\text{TGF}\beta$ também foi demonstrado. FRANK et al. (1995) avaliaram a possibilidade das citocinas produzidas pelas células inflamatórias em aumentar a expressão do mRNA para VEGF. Demonstraram que $\text{TNF}\alpha$, $\text{TGF}\beta 1$ e IL-1 exercem este efeito.

A agregação de células inflamatórias na área da ferida pode auxiliar na eliminação de microorganismos invasores e reduzir a possibilidade de infecção.

(iii) PHA poderia se ligar e interagir com os receptores, na membrana plasmática, ativando enzimas ou segundos mensageiros. A mensagem transportada até o núcleo podem alterar a expressão gênica e a síntese de proteínas (MODY et al., 1995).

(iv) Esta lectina poderia aumentar a expressão dos receptores para os fatores de crescimento, facilitando a interação entre ambos. KAPLOWITZ & HAAR (1988) relataram que, em fibroblastos cultivados na presença de PHA, ocorreu um aumento de setenta e cinco por cento dos receptores para EGF na membrana citoplasmática.

Possivelmente WGA retardou a reparação pois exerceria influência negativa nas etapas de migração celular, alterando ou impedindo as interações célula – célula e das células à matriz. Além disso, esta lectina não ativou as células inflamatórias, essenciais neste processo e exerceu efeito inibidor sobre a proliferação dos fibroblastos *in vitro*. Uma variedade de efeitos inibitórios sobre a função celular, induzida pela lectina WGA, foram relatadas (KAPLOWITZ & HAAR, 1988).

Neste trabalho foi constatado que WGA provocou fraca reação inflamatória, mesmo quando aplicada numa concentração molar quatro a quinze vezes superior à da jacalina e de PHA, respectivamente.

Como esta lectina exerce efeito inibitório sobre o metabolismo dos linfócitos (GREENE & WALCHMANN, 1980), a ativação destas células e, conseqüentemente, a secreção das linfocinas ativadoras de outras células, não ocorrem na sua presença.

Ao reagirem com alguns dos receptores presentes na membrana citoplasmática, a lectina pode modificar a adesão e conseqüentemente a migração das células inflamatórias, das células epiteliais e dos fibroblastos, durante o reparo tecidual.

Segundo OPPENHEIMER-MARKS & GRINNELL (1981), WGA se liga aos receptores de membrana para a fibronectina plasmática ou a receptores próximos a este, interferindo na adesão das células renais de hamster ao substrato. A lectina foi

capaz de se ligar a mais de uma glicoproteína de superfície celular, sendo possível a ligação aos glicosídeos, como o ácido neuramínico, envolvidos na função de receptores para as fibronectinas.

ASAGA & YOSHIZATO (1992) descrevem a interação de WGA com os receptores da família das integrinas, presentes na superfície dos fibroblastos, modificando a interação destas células com os componentes da matriz extracelular. Segundo estes autores, além dos receptores para a fibronectina plasmática, possivelmente outros componentes estariam envolvidos, interferindo na adesão das células à matriz.

DICORLETO & DE LA MOTTE (1989) demonstraram que WGA inibe completamente a ligação de monócitos humanos às células endoteliais humanas ou da linhagem U937 de porco. Sugeriram que WGA inibiu a interação célula - célula por ligação a distintos açúcares .

Segundo VAN DE WATER (1997), a presença de proteínas plasmáticas, tais como fibrina/fibrinogênio e fibronectina, foram importantes nos processos que ocorrem durante os estágios iniciais da reparação, conduzindo a formação do tecido de granulação. A interação de WGA com os receptores para a fibronectina pode contribuir no atraso da formação do tecido de granulação.

Foi demonstrado que WGA inibe a ligação dos ^{125}I -FGE à superfície dos fibroblastos, possivelmente por se ligarem aos mesmos receptores (CARPENTER & COHEN, 1977; KAPLOWITZ, 1985). Desta forma, a lectina competiria com os receptores para os fatores de crescimento celular, influenciando no atraso da formação do tecido de granulação.

A jacalina exerce algumas das atividades biológicas que são importantes nas diversas etapas da reparação. Incluem-se, entre outras, a ação mitogênica sobre os linfócitos, a estimulação da secreção de fatores de crescimento, a estimulação indireta de macrófagos e a indução de reação inflamatória local. Apesar destas características, não exerce influência na reparação tecidual.

As análises histológicas nos cortes corados com HE demonstraram que, apenas no período correspondente ao sétimo dia após a excisão, houveram indicativos de maior maturação do tecido de granulação. A partir do décimo primeiro dias após a excisão, a morfologia do tecido de granulação e, conseqüentemente, a reparação foi semelhante a do controle.

A atividade mitogênica da jacalina sobre os linfócitos T foi demonstrada por SAXON et al. (1987) e PINEAU et al. (1990), mas MIRANDA-SANTOS et al. (1991) atribuíram toda a atividade mitogênica do extrato de *A. integrifolia* à artocarpina.

O uso da jacalina na indução da produção de linfocinas pelas células mononucleares foi observado. CRANE et al. (1984) demonstraram a produção de INF γ pelos hibridomas, os quais foram formados pelas células T estimuladas com a jacalina e pelas células T tumorais. DALMAU et al. (1989) afirmaram que a jacalina é um excelente ativador da produção de fatores de crescimento de células T, por esplenócitos de ratos. FELIPE et al. (1995) demonstraram o aumento e a atividade fagocitária dos macrófagos estimulados com esta lectina e que a ativação, provavelmente, depende da secreção de INF γ . MIRANDA-SANTOS et al. (1991a) afirmam que a jacalina estimula a síntese de IL-3 e de GM-CSF.

A quimiotaxia sobre leucócitos não foi observada em ratos, apesar da atividade quimiotática sobre neutrófilos, na cavidade peritoneal de camundongos ter sido demonstrada por SAKAMOTO et al. (1995a).

Embora desenvolveu reação inflamatória no local de injeção, onde predominaram as células mononucleares, o acúmulo destas células no local de injúria não promoveu os diversos mecanismos que ativam a reparação. Possivelmente não ocorreu a ativação das células e/ou a liberação dos fatores de crescimento de fibroblastos. Estudos das células mononucleares presentes na inflamação, podem relacionar o fenótipo das células, suas funções e a influência na reparação. Linfócitos T_{H1} sintetizam linfocinas que atuam na atração, proliferação e ativação de macrófagos. Porém, os linfócitos fenotipicamente classificados como

T_{H2}, sintetizam interleucinas que não ativam macrófagos. Esta subpopulação ativa linfócitos B, os quais não exercem influência na reparação (PAUL, 1993).

Provavelmente, a jacalina não mimetiza a função das lectinas endógenas, facilitando o mecanismo de adesão. Como foi demonstrado por SAKAMOTO et al. (1995a) a jacalina não exerce efeito quimiotático sobre leucócitos, em ratos.

O uso de outro modelo experimental no estudo da influência da jacalina na reparação seria interessante. Permitiria uma análise comparativa e poderia contribuir para uma melhor discussão do efeito desta lectina no processo de reparo, em diferentes espécies.

CONCLUSÕES

As lectinas PHA e artocarpina foram adequadamente purificadas em cromatografia de afinidade, utilizando ovomucóide como matriz.

O efeito das lectinas sobre o reparo de pele de ratos dependeu da lectina e de suas atividades biológicas, as quais aceleraram ou retardaram este processo.

A fitohemaglutinina PHA acelerou a reparação. A lectina de germe de trigo, WGA, retardou a reparação. A jacalina porém, não influenciou o processo.

A avaliação macroscópica foi realizada por meio das medidas da retração das feridas. Este procedimento não mostrou relação com o resultado das análises histológicas.

As lectinas induziram reações inflamatórias bem localizadas, no local de injeção, porém com intensidade e cinética celular diferentes.

Uma relação direta entre a reação inflamatória provocada pelas lectinas e a reparação não pode ser realizada.

A maior maturação na formação do tecido de granulação pela lectina PHA não esteve relacionada com seu efeito direto sobre os fibroblastos, mas possivelmente, nas etapas iniciais do processo, envolvendo as células inflamatórias e a produção de citocinas.

Nenhuma das lectinas ativou, diretamente, a proliferação de fibroblastos *in vitro*.

SUMMARY

Wound healing is a complex and dynamic process, characterized by the integrated actions of different cells. Lectins are glycoproteins which can present several biological activities. Many of lectin activities may contribute to repair including increased production of cytokines, and activation of inflammatory cells and fibroblasts.

The purpose of this work was to evaluate *in vivo* effects of PHA (*Phaseolus vulgaris* phytohemagglutinin), WGA (*Triticum vulgare* lectin) and jacalin (*Artocarpus integrifolia* lectin) on wound healing *in vivo*.

Male rats were anesthetized and excisions of 8 mm in diameter were performed in their dorsal skin. The lectins (300ug/mL) were then placed on the wound. Changes in the surface area were recorded everyday as compared to the initial wound size. The rats were then killed at the 3rd, 7th, 11th, or 15th day. The specimens were harvested for histological examination, and stained with hematoxylin-eosin or silver impregnation. The inflammatory reaction was histologically evaluated around the area of lectin injection. The direct fibroblast proliferation induced by these lectins were analyzed.

PHA accelerated tissue repair and enhanced the rate of wound contraction when applied to wound sites. Furthermore, PHA increased the reepithelization, collagen deposition and also promoted inflammatory reaction. PHA decreased fibroblast proliferation *in vitro*. WGA delayed wound repair when applied locally

on the wound. WGA promoted weak inflammatory reaction and reduced the granulation tissue maturation. Significant decreased fibroblast proliferation were observed. Jacalin did not have a significant effect on repair and fibroblast proliferation. Jacalin promoted inflammatory reaction when applied locally.

PHA may induce wound healing due to the activation of inflammatory cells. Activated leukocytes release growth factors, such as ILs, $\text{INF}\gamma$ and FAFs, which have an important role in the repair process. WGA interact with different glycoproteins, such as plasma fibronectin receptor, and modify the cell and extracellular matrix interaction. Although jacalin induced the proliferation of human lymphocytes and production of lymphokines, it did not influence the cicatrization process.

Key-words: PHA, WGA, jacalin, lectins, repair, inflammation, fibroblasts.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 1) ALBUQUERQUE, D.A.; CAMPOS-NETO, A. & SILVA, J.S. **Ação carreadora e imunoestimulante da jacalina sobre a resposta de anticorpos anti-TNP.** (Apresentado ao Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia, 20., Angra dos Reis, 1995)
- 2) ALFENAS, A.C. *et al.* **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais.** Viçosa : Universidade Federal de Viçosa, 1991. p102-103.
- 3) ALIBERTI, J.C. *et al.* **KM+, uma lectina ligante de D-manose, induz produção de IL-12 por macrófagos de camundongos.** (Apresentado ao Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia, 20., Angra dos Reis, 1995)
- 4) ALMEIDA, S.M. **Efeito da radiação de elétrons na reparação tecidual.** Piracicaba, 1997. 103p. [Tese (Doutoramento) – FOP-UNICAMP]

* De acordo com a NB-66 de 1978, da ABNT. Abreviatura dos periódicos de conformidade com a "World Lista of Scientific Periodicals"

- 5) ANASTASSIADES, T.P. & WOOD, A. Effect of soluble products from lectins-stimulated lymphocytes on the growth, adhesiveness, and glycosaminoglycan synthesis of cultured synovial fibroblastic cells. **J. Clin. Invest.**, New York, **68**: 792-802, 1981.
- 6) APLIN, J.D. *et al.* Reversible cross-linking of cellular components of adherent fibroblasts to fibronectin and lectin-coat substrata. **Exp. Cell Res.**, Orlando, **128**: 133-142, 1980.
- 7) ASAGA, H. & YOSHIZATO, K. Recognition of collagen by fibroblasts through cell surface glycoproteins reactive with *Phaseolus vulgaris* agglutinin. **J. Cell Sci.**, Cambridge, **101**: 625-633, 1992.
- 8) BARDOCZ, S.; EWEN, S.W.B. & PUSZTAI, A. Binding and endocytosis of *Phaseolus vulgaris* L₄ lectin and insulin by 3T3 and L₆ cells – effects on protein synthesis. In: VAN DRIESCHE, E. *et al.*, ed. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. Denmark : Textop, 1993. v. 8. p.258-264.
- 9) BENJAMIN, C.F. *et al.* Inflammatory and anti-inflammatory effects of soybean agglutinin. **Braz. J. med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, **30** (7): 873-881, 1997.
- 10) BEUTH, J. *et al.* Importance of lectins for the prevention of bacterial infections and cancer metastases. **Glycoconj. J.**, Hampshire, **12**: 1-6, 1995.
- 11) BOYLE, M.D.P. *et al.* Nerve growth factor: a chemotactic factor for polymorphonuclear leukocytes in vivo. **J. Immunol.**, Baltimore, **134** (1): 564-568, 1985.

- 12) BUNN-MORENO, M.M. & CAMPOS-NETO, A. Lectin(s) extracted from seeds *Artocarpus integrifolia* (jackfruit): potent and selective stimulator(s) of distinct human T and B cell functions. **J. Immunol.**, Baltimore, **127** (2): 427-429, 1981.
- 13) BRESLING, R.J. *et al.* Generation of an anti-Interleukin 2 factor in healing wounds. **Arch. Surg.**, Chicago, **123**: 305-308, 1988a.
- 14) _____, *et al.* Supressor cell generation during normal wounds healing. **J. Surg. Res.**, San Diego, **44** (4): 321-325, 1988b.
- 15) BROOKS, P.C.; CLARK, R.A.F. & CHERESH, D.A. Requeriment of vascular integrin $\alpha_v\beta_3$ for angiogenesis. **Science**, Washington, **264**: 569-571, 1994.
- 16) BROWN, D.M. *et al.* Decreased wound contraction with fibrin glue-treated skin grafts. **Arch. Surg.**, Chicago, **127**: 404-406, 1992.
- 17) CARPENTER, G. & COHEN, S. Influence of lectins on the binfing of ^{125}I -labeled EGF to human fibroblasts. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, New York, **79** (2): 545-552, 1977.
- 18) CLARCK. R. A. Regulation of fibroplasia in cutaneous wound repair. **Am. J. Med. Sci.**, New York, **306** (1) :42-48, 1993.
- 19) CRANE, I. *et al.* The preparation of interferon gamma- producing T-cell hibridomas from jacalin stimulated T lymphocytes and the SH9 T-cell line. **Immunol.**, Oxford, **53**: 855-859, 1984.

- 20) COSTA, C. P. **Interações de lectinas de semente de jaca (*Artocarpus integrifolia*) com glicoproteínas da saliva e do soro humano.** Piracicaba, 1989. 91p. [Tese (Doutoramento) – FOP-UNICAMP]

- 21) COTRAN, R.S.; KUMAR, V. & ROBBINS, S.L. **Inflammation and Repair.** In: _____. Robbins pathologic Basis of disease. 5. ed. Philadelphia : Saunders, 1994. Cap. 3, p. 51-92.

- 22) CUMMINGS, R.D. & KORNFELD, S. Characterization of the structural determinants required for the high affinity interaction of asparagine-linked oligosacharides with immobilized *Phaseolus vulgaris* leukoagglutinating and erythroagglutinating lectins. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, **25** (19): 11230-11234, 1982.

- 23) DALMAU, S.R.; MACIEL, C.M. & FREITAS, C.S. Jacalin: an excellent lectin for obtaining T cell growth activity from rat spleen cells. **Braz. J. med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, **22**: 1111-1120, 1989.

- 24) DALMAU, S.R.; FREITAS, C.S. & SAVINO, W.A Modified assay for measuring thymocyte co-stimulatory activity. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **88**(3): 419-425, 1993.

- 25) DERBYSHIRE, E. *et al.* The mitogenic atividades of bean proteins determined by assay of the incorporation of ³H-thymidine by human lymphocytes. **Energ. Nucl. Agric.**, Piracicaba, **9**(1): 21-27, 1988.

- 26) DiCORLETO, P.E. & DE LA MOTTE. Role of cell surface carbohydrate moieties in monocytic cel adhesion to endothelium in vitro. **J. Immunol.**, Baltimore, **143** (11): 3666-3672, 1989.

- 27) DOHLHMAN, J.G. *et al.* Structural diversity of the fibroblast-activating factors generated by human blood monocytes and U937 cells. **J. Immunol.**, Baltimore, **134** (5): 3185-3200, 1985.
- 28) DUNCAN, M.R. & BERMAN, B. γ -interferon is the lymphokine and β -interferon the monokine responsible for inhibition of fibroblast collagen production and late but not early fibroblast proliferation. **J. Exp. Med.**, New York, **162** :516-527, 1985.
- 29) FAVERO, J. *et al.* Jacalin, a lectin from *Artocarpus heterophyllus*, interacts with the CD4 cell surface and demonstrates ant-viral properties against human immunodeficiency virus. *In*: VAN DRIESCHE, E. *et al.* ed. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. Denmark : Textop, 1993. v. 8. p334-340.
- 30) FELIPE, I.; BIM, S. & SOMENSI, C C. Increased clearance of *Candida albicans* from the peritoneal cavity of mice pretreated with concanavalin A or jacalin. **Braz. J. med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, **28**: 477-483, 1995.
- 31) FELSTED, R.L. *et al.* Comparasion of *Phaseolus Vulgaris* cultivars on the basis of isolectins differences. **Int. J. Biochem.**, Elmsford, **13**: 549-557, 1981.
- 32) FLEISHMANN, G. *et al.* A one-step procedure for isolation and resolution of the *Phaseolus vulgaris* isolectins by affinity chromatography. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**, Berlin, **366**: 1029-1032, 1985.
- 33) FRANCK, S. *et al.* Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, **270** (21): 12607-12613, 1995.

- 34) FREIER, T.; FLEISCHMANN, G. & RUDIGER, H. Affinity chromatography on immobilized hog gastrin mucin and ovomucoid. A general method for isolation of lectins. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**, Berlin, **366**: 1023-1028, 1985.
- 35) GERVASI, D.C. *et al.* Carbohydrate-mediated regulation of matrix metalloproteinase-2 activation in normal human fibroblast and fibrosarcoma cells. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, New York, **228**: 530-538, 1996.
- 36) GIENL, S. R.; LI, Y. & HAYGLASS, K.T. Comparison of [3H]thymidine incorporation with MTT- and MTS- based bioassays for human and murine IL-2 and IL-4 analysis: Tetrazolium assays provide markedly enhanced sensitivity. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, **187**: 85-93, 1995.
- 37) GILLIS, S.; SCHEID, M. & WATSON, J. Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. III. The isolation and the characterization of interleukin 2 producing T cell lymphomas. **J. Immunol.**, Baltimore, **125**: 2570-2578, 1980.
- 38) GLAD, C. & BORREBAECK, C.A.K. Affinity of phytohemagglutinin (PHA) isolectins for serum proteins and regulation of the lectins-induced lymphocyte transformation. **J. Immunol.**, Baltimore, **114** (4): 2126-2132, 1984.
- 39) GOLDMAN, S.R. Contribuição ao estudo farmacológico das espécies *Sedum praealtum* ADC. e *Symphhytum officinale* L. Efeitos cicatrizante e analgésico. São Paulo, 1983. 78p. [Tese (Mestrado) – Departamento de Farmacologia do Instituto de Biomédicas – USP]

- 40) GONÇALVES, R.B. & COSTA, C.P. Isolation of the lectin and L₄ isolectin from *Phaseolus vulgaris* by affinity chromatography on insoluble ovomucoid. **Braz. J. med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, **28**: 191-194, 1995.
- 41) GREENE, W.C. & WALDMANN, T.A. Inhibition of human lymphocyte proliferation by the non-mitogenic wheat germ agglutinin. **J. Immunol.**, Baltimore, **124**: 2979-2984, 1980.
- 42) _____, *et al.* Stimulation of immunoglobulin biosynthesis in human B cells by wheat germ agglutinin. I. Evidence that WGA can produce both a positive and negative signal for activation of human lymphocytes. **J. Immunol.**, Baltimore, **127**(2): 799-804, 1981.
- 43) HÄKKINEN, L. *et al.* Human granulation - tissue fibroblast show enhanced proteoglycan gene expression and altered response to TGF- β 1. **J. Dent. Res.**, Washington, **75** (10) :1767-1778, 1996.
- 44) HENKE, C.A. *et al.* CD44-related chondroitin sulfate proteoglycan, a cell surface receptor implicated with tumor cell invasion, mediates endothelial cell migration on fibrinogen and invasion into a fibrin matrix. **J. Clin. Invest.**, New York, **97** (11): 2541-2552, 1996.
- 45) HOLMSKOV, U. *et al.* Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. **Immunol. Today**, Cambridge, **15** (2): 67-73, 1994.
- 46) ITO, Y. *et al.* Interferon induction in mouse spleen cells by mitogenic and nonmitogenic lectins. **J. Immunol.**, Baltimore, **132**(5): 2440-2444, 1984.

- 47) KABIR, S. Jacalin: a jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed- derived lectin of versatile applications in immunobiological research. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, **212** (2): 193-211, 1998.
- 48) KANELLOPOULOS, J.M. *et al.* The mitogenic lectin from *Phaseolus vulgaris* does not recognize the T3 antigen of human T lymphocytes. **Eur. J. Immunol.**, Weinheim, **15**: 457-486, 1985.
- 49) KAPLOWITZ, P.B. Wheat germ agglutinin and concanavalin A inhibit the response of human fibroblasts to peptide growth factors by a post-receptor mechanism. **J. Cell. Physiol.**, Philadelphia, **124**: 474-480, 1985.
- 50) _____. & HAAR, J.L. Antimitogenic actions of lectins in cultured human fibroblasts. **J. Cell. Physiol.**, Philadelphia, **136**: 13-22, 1988.
- 51) KEARSE, K.P. & SINGER, A. Isolation of immature and mature T cell receptor complexes by lectin affinity chromatography. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, **167**: 75-81, 1994.
- 52) KOVACS, E.J. *et al.* Production of fibrogenic cytokines by interleukin-2-treated peripheral blood leukocytes: expression of transforming growth factor- β and plated-derived growth factor B chain genes. **Obstetrics & Gynecology**, Amsterdam, **82**(1): 29-36, 1993.
- 53) KUBOTA, Y. *et al.* Collagen prolyl hydroxylase inhibitor and reduced collagen formation in cotton pellet-induced granuloma an skin wound healing in rats. **Br. J. Derm.**, Oxford, **113**: 559-563, 1985.

- 54) LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, **277**: 680-685, 1970.
- 55) LAFONT, V. et al. The lectin jacalin specifically triggers cell signaling in CD4+ T lymphocytes. **Cell. Immunol.**, New York, **181**(1): 23-29, 1997.
- 56) LAWMAN, M.J.P. *et al.* Nerve growth factor accelerates the early cellular events associated with wound healing. **Exp. Mol. Pathol.**, San Diego, **43**: 274-281, 1985.
- 57) LEAVITT, R.D.; FELSTED, R.L. & BACHUR, N.R. Biological and biochemical properties of *Phaseolus vulgaris* isolectins. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, **252**(9): 2961-2966, 1977.
- 58) LEMAIRE, I. & DUBOIS, C. In vitro suppression of fibroblast growth inhibitory lymphokine production by bestos. **Clin. exp. Immunol.**, Oxford, **53**: 239-248, 1983.
- 59) LINEWEAVER, H. & MURRAY, C.M. Identification of the trypsin inhibitor of egg white with ovomucoid. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, **171**: 565-581, 1947.
- 60) LIS, H. & SHARON, N. Lectin as molecules and tools. **Ann. Rev. Biochem.**, New York, **55**: 35-67, 1986.
- 61) LOWRY, O.H. *et al.* Protein measurement with the Folin-phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, **193**: 265-275, 1951.

- 62) MIRANDA-SANTOS, I.K.F. *et al.* A crude extract of *Artocarpus integrifolia* contains two lectins with distinct biological activities. **Immunol. Lett.**, Amsterdam, **31**: 65-72, 1991a.
- 63) _____. *et al.* Activation of T and B cells by a crude extract of *Artocarpus integrifolia* is mediated by a lectin distinct from jacalin. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, **140**: 197-203, 1991b.
- 64) MISQUITH, S.; RANI, P.G. & SUROLIA, A. Carbohydrate binding specificity of the B-cell maturation mitogen from *Artocarpus integrifolia* seeds. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, **269** (48): 30393-30401, 1994.
- 65) MIZEL, S.B. The Interleukins. **FASEB J.**, Bethesda, **3**: 2379-2384, 1989.
- 66) MODY, R.; JOSHI, S. & CHANEY, W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, New York, **33** (1): 1-10, 1995.
- 67) MOREIRA, R.A. & AINOUEZ, I.L. Isolectins from jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) seeds. **Plant. Physiol.**, Minneapolis, **61**: 118, 1978. [Supplement]
- 68) _____. & _____. Lectins from seeds of jackfruit (*Artocarpus integrifolia*): isolation and purification of two isolectins from the albumin fractions. **Biol. Plant.**, Praha, **23** (3): 186-192, 1981.
- 69) MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, **65**: 55-63, 1983.

- 70) NAGATA, Y. & BURGER, M.M. Wheat germ agglutinin molecular characteristics and specificity for sugar binding. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, **249** (10): 3116-3122, 1974.
- 71) NEILSON, E.G., PHILLIPS, S M. & JIMENEZ, S. Lymphokine modulation of fibroblast proliferation. **J. Immunol.**, Baltimore, **128** (3): 1484-1486, 1982.
- 72) NOWELL, P. C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes. **Cancer Res.**, Chicago, **20**: 426-6, 1960.
- 73) OPPENHEIMER-MARKS, N. & GRINNELL, F. Effects os plants lectins on the adhesive properties of baby hamster kidney cells. **Eur. J. Cell Biol.**, Stuttgart, **23**: 286-294, 1981.
- 74) PAUL, W.E. **The Imune System**. An Introduction. *In*: _____. **Fundamental Immunology**. 3 ed. New York: Raven Press, 1993. Cap. 1, p. 1-20.
- 75) PEARSE, A.G.E. **Applied histochemistry of simple and glycosylated proteins**. *In*: _____. **Theoretical and Applied. Analytical Technology**. 4. ed. Churchill Livinstone. 1985. v. 2. p.594.
- 76) PEUMANS, W.J. & VAN DAMME, E.J.M. The role of lectins in the defense of plants. *In*: VAN DRIESSCHE, E. *et al.* ed. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. Denmark: Textop, 1993. v. 8. p82-91.
- 77) PINEAU, N. *et al.*. Jacalin: a lectin mitogenic for human CD4 T lymphocytes. **Clin. exp. Immunol.**, Oxford, **80**: 420-425, 1990.

- 78) PORETZ, R.D. *et al.* Lectin-induced accumulation of large lysosomes in cultured fibroblasts. **Exp. Cell Res.**, Orlando, **128**: 133-142, 1980.
- 79) PREUD'HOMME, J. L.; AUCOUTURIER, P. & GUALDE, N. Jacalin and arborcarpin. **J. Immunol. Methods**, Amsterdam, **146**: 259-260, 1992
- 80) REED, B.R. & CLARCK, R.A. F. Cutaneous tissue repair: Practical implications of current knowledge. II . **J. Amer. Acad. Dermatol.**, Santa Louis, **13** (6): 919-944, 1985.
- 81) REICHERT, C.F. *et al.* Lectin induced blast transformation of human lymphocytes. **Nature**, London, **242**: 146-148, 1973.
- 82) REISFELD, R.A.; LEWIS, U.J. & WILLIAMS, D.E. Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrilamide gels. **Nature**, London, **195**: 281-283, 1962.
- 83) ROQUE-BARREIRA, M.C.; GREENE, L.J. & CAMPOS-NETO, A. Purification of jacalin on agarose-D-galactose. **Braz. J. med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, **19** (4-5): 638A, 1986.
- 84) _____. & CAMPOS-NETO, A. Jacalin: an IgA-binding lectin. **J. Immunol.**, Baltimore, **134** (3): 1740-1743, 1985.
- 85) SAKAMOTO, M.; DIAS-BARUFFI, M.; & ROQUE-BARREIRA, M. C. A. **Seletividade na migração de neutrófilos induzida por jacalina.** (Apresentado ao Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia, 20., Angra dos Reis, 1995 a)

- 86) _____, *et al.* **Lectina Quimioatraente intravascular: Inibição da migração de neutrófilos.** (Apresentado ao Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia, 20., Angra dos Reis, 1995b)
- 87) SANTOS-DE-OLIVEIRA, R. *et al.* A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. **J. Immunol.**, Baltimore, **153**: 1798-1807, 1994.
- 88) SAXON, A.; TSUI, F. & MARTINEZ-MAZA, O. Jacalin, an IgA-binding lectin, inhibits differentiation of human B cells by both a direct effect and by activating T-suppressor cells. **Cell. Immunol.**, New York, **104**: 134-141. 1987.
- 89) SHARON, N. & LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, Washington, **246**: 227-234, 1989.
- 90) SMITH, C.W. *et al.*, Recognition of endothelial determinant for CD18 – dependent neutrophil adherence to transendothelial migration. **J. Clin. Invest.**, New York, **82** : 1746-175, 1988.
- 91) SOUBHIA, A.M.P.; MARTINELLI, C. & DE LUCIA, M.B.I. Cicatrização de feridas cutâneas após administração de vitamina B₆. Estudo histológico em ratos. **Ver. reg. Araçatuba**, Araçatuba, **13**: 15-18, 1992.
- 92) SPOLIDORIO, L. C. **Efeito da ciclosporina sobre o processo de reparo em tecido cutâneo de rato.** Piracicaba, 1991. 76p. [Tese (Mestrado) – FOP-UNICAMP]
- 93) ST. JOHN, A.C. *et al.* Internalization and intracellular fate of *Wiseria floroibunda* agglutinin in BALB/c 3T3 fibroblasts. **Exp. Cell Res.**, Orlando, **128**: 143-150, 1980.

- 94) STULNIG, T.; SCHUWEIGER, M. & HIRSCH-KAUFFMANN, M. Duchenne muscular dystrophy: lack of differences in the expression of endogenous carbohydrate- an heparin- binding proteins (lectins) in culture fibroblast. **Eur. J. Cell Biol.**, Stuttgart, **62** :173-181, 1993.
- 95) SURESHKUMAR, G.; APPUKUTTAN, P.S. & BASU, D. α -D-galactose-specific lectin from jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) seed. **J. Biosci.**, Bangalore, **4**: 257-261, 1962.
- 96) SYMON, F.A. & WARDLAW, A.J. Selectins and their counter receptors: a bitter sweet attraction. **Thorax**, Baltimore, **51**: 1155-1157, 1996.
- 97) TEDDER, T.F. et al. The selectins: vascular adhesion molecules. **FASEB J.**, Bethesda, **9**: 866-873, 1995.
- 98) TOWBRIDGE, H.O. & EMLING, R.C. **Inflamação**: Uma revisão do processo. 4. ed. São Paulo: Quintessence Publishing Co. Inc., 1996. p172.
- 99) TURCK, C.W.; DOHLMAN, J.G. & GOETZL, E.J. Immunological mediators of wound healing and fibrosis. **J. Cell. Physiol.**, Philadelphia, **5**: 89-93, 1987. [Supplement]
- 100) UZUNIAN, A. Estudo morfométrico e histoquímico de algumas fases do processo de reparação de pele de ratos albinos: ação da carragenina. **Rev. paul. Med.**, São Paulo, **93**: 1-5, 1979.

- 101) VAN DE WATER, L. Mechanisms by which fibrin and fibronectin appear in healing wounds: implications for Peyronie's disease. **J. Urol.**, Baltimore, **157**:306-310, 1997.
- 102) VAN WAUNE, J.; AERTS, F. & BOER, M. Cytokine production by phytohemagglutinin-stimulated human blood cells: Effects of corticosteroids, T cell immunosuppressants and phosphodiesterases IV inhibitors. **Inflamm. Res.**, Basel, **44**: 400-405, 1995.
- 103) WAHL, S. M. & GATELY, C. Modulation of fibroblast growth by a lymphokine of human T cell and continuous T cell line origin. **J. Immunol.**, Baltimore, **130** (3): 1226-1230, 1983.
- 104) _____; WONG, H & McCARTNEY-FRANCIS, N. Role of growth factors in inflammation and repair. **J. Cell Biochem.**, New York, **40**:193-199, 1989.
- 105) WIESER, R.J. & OESCH, F. Contact-dependent regulation of growth of diploid human fibroblasts is dependent upon the presence of terminal galactose residues on plasma membrane glycoproteins. **Exp. Cell Res.**, Orlando, **176**: 80-86, 1988.
- 106) _____; BAUMANN C. E. & OESCH, F. Cell-contact mediated modulation of the sialylation of contactinhibin. **Glycoconj. J.**, Hampshire, **12**: 672-679, 1995.
- 107) WISLER, R.L. & YATES, A.J. Regulation of lymphocyte responses by human gangliosides. I- characteristics of inhibitory effects and the induction of impaired activation. **J. Immunol.**, Baltimore, **125**: 2106-2111, 1980.

- 108) XIAOBING, F. *et al.* In vivo effects of tumor necrosis factor α on incised wound and gunshot wound healing. **J. Trauma Inj. Infect. Crit. Care**, Baltimore, **40** (3): S140-S143, 1996.
- 109) YOUNG, N.M.; JOHNSTON, R.A.Z.; WATSON, D.C. The aminoacid sequences of jacalin and the *Madura pomira* agglutinin. **Fed. Eur. Biochem. Soc.**, Amsterdam, **282**: 382-384, 1991.