

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**  
**CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES LECTÍNICAS, TÓXICAS E**  
**HEMOLÍTICAS DO FRUTO DE *CARYOCAR BRASILIENSIS***

**FERNANDA MARIA SANTIAGO**

**ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ROBERTO MINEO**

Monografia apresentada à Coordenação do  
Curso de Ciências Biológicas da Universidade  
Federal de Uberlândia para a obtenção do grau  
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG

Dezembro – 98

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDO DAS PROPRIEDADES LECTÍNICAS, TÓXICAS E  
HEMOLÍTICAS DO FRUTO DE *CARYOCAR BRASILIENSIS*

Fernanda Maria Santiago

Aprovada pela banca examinadora em 22/12/98

Nota 7,0

*Análise*  
Análise da banca examinadora  
Prof. Dr. José Roberto Mineo  
Prof.ª Maria Aparecida de Souza  
Prof. Dr. Sílvio Favoreto Júnior

Prof. Dr. José Roberto Mineo  
orientador

*Maria Aparecida de Souza*  
Prof.ª Maria Aparecida de Souza  
Co-orientadora

*Maria Aparecida de Souza*  
Prof. Dr. Sílvio Favoreto Júnior  
Co-orientador

Uberlândia, 22 de Dezembro de 1998.

Aos Meus Pais, Gilberto e Maria José, pelo exemplo de trabalho, pelos ensinamentos, oportunidades oferecidas e que mesmo estando longe nunca deixaram de acreditar em minha capacidade.

“Uma águia tem dentro de si o chamado do infinito. Seu coração sente os picos mais altos das montanhas. Por mais que seja submetida a condições de escravidão, ela nunca deixará de ouvir sua própria natureza de águia que a convoca para as alturas e para a liberdade.”

(Leonardo Boff)

## AGRADECIMENTOS

Aos meus irmãos, Patrícia e Leonardo, pelo apoio, amizade e carinho.

Ao meu namorado, Tiago Mineo, pela compreensão e apoio nos momentos mais difíceis, e pela persistência de estar sempre ao meu lado.

Ao meu orientador, José Roberto Mineo, pelo apoio nos momentos de maiores dificuldades, pela amizade e pelo estímulo que me levou a chegar ao fim deste trabalho.

A minha co-orientadora, Maria Aparecida de Souza, pela amizade, carinho, e confiança, proporcionando ensinamentos valiosos para minha formação

Ao amigo e Prof. Silvio Favoreto Júnior, pelo apoio, amizade e pelas sugestões oportunas para desenvolvimento desse trabalho.

Ao Dr. Fernando Vinhal, por nos ceder o corante Fluoro-Quench-AO/EB, de grande importância para realização dos experimentos com células.

Aos meus amigos do laboratório de Imunologia, Kelly, Marta, Gabriela, Cidinha, Henrique, Alexandre, Hugo, Omar, Juninho, Júnio, pelos momentos de alegria e ajuda mútua.

Aos meus familiares que mesmo estando longe sempre me apoiaram em todas as etapas de minha formação.

As minhas amigas Adriana, Lenita, Claudia que estiveram sempre ao meu lado e souberam entender os meus momentos de chateação.

Ao órgão de fomento à pesquisa: CNPq

## Sumário

O presente estudo teve como objetivo isolar e caracterizar as proteínas do extrato do fruto de *Caryocar brasiliensis*. Analisou-se a presença de propriedade aglutinante dos extratos protéicos deste vegetal, por meio de técnica de hemaglutinação ativa, para se verificar uma possível atividade lectínica. Em adição, avaliou-se a presença de efeitos tóxicos em células de mamíferos e do protozoário *T. gondii*.

Atividade lectínica foi observada nos extratos do fruto de *C. brasiliensis*, sendo que os maiores títulos hemaglutinantes foram observados quando se utilizou o extrato endocárpico, o qual apresentou proteínas de diferentes pesos moleculares aparentes, variando de 12 a 82 kDa. Esta lectina apresenta atividade tóxica para células de mamíferos, como macrófagos peritoneais e de linhagem contínua, (J774) clone E-9 de hibroma murino e enterócito murino (IEC0 e para formas taquizóitas de *T. gondii*, alterando sua morfologia ao nível estrutural e ultra-estrutural e interferindo nos processos de adesão e invasão deste protozoário à célula hospedeira. Esta lectina apresentou atividade enterotóxica em experimentos *in vivo* utilizando-se camundongos BALB/c neonatos.

Esta lectina apresentou uma marcante atividade hemolítica, sendo que o componente responsável por esta atividade biológica é parcialmente sensível ao aquecimento e tratamento com  $\beta$ -mercaptoetanol, e muito pouco sensível a agente quelante de cálcio. Foi observado que a lectina de *C. brasiliensis* apresentou um componente molecular de peso aparente de 80 kDa com atividade proteásica.

Novos estudos são necessários para correlacionar as atividades biológicas do extrato do endocarpo de *C. brasiliensis* com os seus diferentes componentes moleculares.

## ÍNDICE

<b>I – INTRODUÇÃO</b>	3
I.1 – LECTINAS	3
I.1.1 - Aspectos gerais	3
I.1.2-Interação proteína-carboidrato na relação parasita -hospedeiro.	4
I.1.2.1 - <i>Toxoplasma gondii</i> como modelo de estudo de mecanismo de adesão e invasão.	7
I.1.3-Lectinas presentes em animais vertebrados e invertebrados.	9
I.1.4-Lectinas vegetais utilizadas em estudos imunológicos.	10
 <b>II – OBJETIVO</b>	 15
 <b>III – MATERIAL E MÉTODOS</b>	 16
III.1 - Obtenção do extrato protéico.	16
III.1.1 - <i>Caryocar brasiliensis</i> .	16
III.2 - Análise dos extratos protéicos de <i>Caryocar     brasiliensis</i> .	18
III.3 - SDS-PAGE	18
III.3.1- Método de coloração pela prata.	19
III.4 - Reação de hemaglutinação.	20
III.4.1 - Obtenção das hemácias.	20
III.4.2 - Ensaio de hemaglutinação.	20
III.5 - Cultura de células.	21
III.5.1- Macrófagos.	22
III.6- Dosagem de óxido nítrico (NO).	22
III.7 - Efeito da atividade biológica do extrato endocárpico de <i>C. brasiliensis</i> sobre hemácias, macrófagos murinos e clone E-9 proveniente de hibridoma murino.	23

IV.3 - Análise da atividade biológica do extrato vegetal sobre macrófagos peritoneais murinos.	40
IV.4 - Atividade de <i>C. brasiliensis</i> sobre hemácias, macrófagos peritoneais murinos e clone E-9.	41
IV.5 - Análise da pré-incubação de <i>T. gondii</i> com extrato do endocarpo de <i>C. brasiliensis</i> .	45
IV.5.1 - Análise da capacidade de invasão de <i>T. gondii</i> tratados com endocarpo de <i>C. brasiliensis</i> .	46
IV.5.2 - Ensaio de invasão de <i>T. gondii</i> , tratados com extrato de endocarpo de <i>C. brasiliensis</i> , em macrófagos e enterócitos.	47
IV.5.3 - Análise do citoesqueleto de <i>T. gondii</i> tratados ou não com extrato do endocarpo de <i>C. brasiliensis</i> .	49
IV.6 – ELISA para detecção de anticorpos.	49
IV.7 - Análise da atividade hemolítica indireta de <i>C. brasiliensis</i> .	50
IV.8 - Análise da atividade enterotóxica do extrato endocárpico <i>C. brasiliensis</i> .	54
IV.9 - Análise da atividade proteolítica do extrato endocárpico de <i>C. brasiliensis</i> .	55
<b>V – DISCUSSÃO</b>	<b>57</b>
<b>VI – CONCLUSÕES</b>	<b>64</b>
<b>VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>66</b>



## LISTA DE TABELAS

1. Proteínas ligantes de carboidrato em protozoários parasitas e seus ligantes na interação parasita-célula hospedeira. 5
2. Títulos de hemaglutinação do extrato endocárpico de *C. brasiliensis* com diferentes suspensões de hemácias obtidas do sangue de camundongos das linhagem: BALB/c, C57Bl/6, DBA/2, NZW e NZB/W ajustadas na concentração de 1% em PBS, tendo como anti-coagulante citrato de sódio a 2%. 38
3. Produção de “NO” por macrófagos peritoneais de camundongos: BALB/c, C57Bl/6, DBA/2, NZW e NZB/W ( $2 \times 10^6$  células por ml de DMEM completo) pré estimulados com tioglicolato de sódio, cultivados na presença de Con-A, LPS, LPS e IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$  ou do extrato do endocarpo de *C. brasiliensis*. 41
4. Percentagem de viabilidade de macrófagos peritoneais murinos e clone E-9 após duas horas de incubação com extrato endocárpico de *C. brasiliensis* nas concentrações de 756,6  $\mu\text{g/ml}$  até 47,3  $\mu\text{g/ml}$ . 42
5. Determinação da viabilidade de taquizoítas, após tratamento de duas horas com extrato do endocarpo de *C. brasiliensis*. 45
6. Determinação da percentagem de *T. gondii* extracelulares (EC), aderidos a membrana (AD) ou internalizados (IC) em macrófagos peritoneais, macrófagos da linhagem J774 e enterócitos de rato (IEC), após tratamento com diferentes concentrações do extrato do endocarpo de *C. brasiliensis*. 48

7. Análise da atividade hemolítica indireta nas diferentes concentrações do endocarpo de *C. brasiliensis*, após 3 horas de observação. 52
8. Determinação da atividade enterotóxica da lectina extraída do endocarpo de *C. brasiliensis* em camundongos neonatos (3 a 4 dias de idade) BALB/c. 54

## LISTA DE FIGURAS

1. Fruto de *Caryocar brasiliensis* (pequi) em corte longitudinal, demonstrando as regiões correspondentes ao epicarpo, mesocarpo e endocarpo. 17
2. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 15% em condições dissociantes e não redutoras dos extratos de *Caryocar brasiliensis*. 36
3. Reação de hemaglutinação com diferentes extratos de *Caryocar brasiliensis*, frente a suspensão de hemácias de camundongos. 39
4. Determinação da intensidade de hemólise em placas hemolíticas contendo extrato de endocarpo de *C. brasiliensis* em diferentes condições. 53
5. SDS-PAGE de amostra de endocarpo de *C. brasiliensis* para avaliação de atividade proteásica sobre gelatina. O gel de poliacrilamida foi preparado a 15% ou 10%. 56

## LISTA DE PRANCHAS

1. Macrófagos peritoneais de camundongos tratados ou não com diferentes concentrações de extrato endocárpico de *C. brasiliensis*, corados com Fluoro-Quench AO/EB. 43
2. Células do clone E-9, originárias de hibridoma de camundongos BALB/c, tratados ou não com diferentes concentrações de extrato endocárpico de *C. brasiliensis*, corados com Fluoro-Quench AO/EB. 44
3. Eletromicrografia do citoesqueleto de taquizoítas de *T. gondii*, incubados durante duas horas com PBS. 49-a
- 4 e 5. Eletromicrografia do citoesqueleto de *T. gondii*, tratados com extrato endocárpico de *C. brasiliensis* na concentração de 756,6 µg/ml, durante duas horas. 49-b,c
6. Eletromicrografia do citoesqueleto de *T. gondii*, tratados por duas horas com extrato endocárpico de *C. brasiliensis* na concentração de 378,3 µg/ml. 49-d
7. Placas hemolíticas para avaliação de efeito tóxico do extrato endocárpico de *C. brasiliensis* sobre hemácias, quando esta lectina foi submetida ou não a condições físico-químicas diferentes. 51

## I - INTRODUÇÃO

### I.1 - LECTINAS

#### I.1.1 - Aspectos gerais

As lectinas representam uma classe de proteínas de origem não imune que se ligam de maneira não covalente a carboidratos e podem apresentar a capacidade de aglutinar células e/ou precipitar conjugados (LIS & SHARON, 1986). Esses compostos são moléculas heterogêneas amplamente distribuídas na natureza podendo ser encontradas nos mais variados tipos de organismos vivos (revisado por LICASTRO *et al.*, 1993). As lectinas são definidas atualmente como proteínas que se ligam a carboidratos, que não são enzimas e nem anticorpos, e não têm atividade enzimática dirigida para carboidratos (CUMMINGS, 1997).

Sugere-se que as interações lectina-carboidrato, possam desempenhar atividades fundamentais, no reconhecimento de células imunes bem como a comunicação entre elas (KERY, 1991). Essa idéia é reforçada devido a glicosilação das moléculas de superfícies de todas as populações de células imunes, bem como pela ocorrência de várias delas. Proteínas ligantes de manose (lectina tipo C) por exemplo, apresentam muitas características semelhantes a galectina 3 (Mac 2), uma proteína expressa com abundância na superfície de macrófagos de sítios inflamatórios. Essa proteína exibe atividade de ligação específica para galactose e lactose, estando envolvida nos processos de regulação dos macrófagos (HAJELA, 1991; LIU *et al.*, 1995).

### I.1.2 - Interação proteína-carboidrato na relação parasita-hospedeiro

As interações parasita-hospedeiro são muito complexas e envolvem múltiplos e complexos receptores e ligantes em ambos os tipos celulares. Os eventos iniciais nesse processo são o reconhecimento e a aderência do parasita à célula hospedeira. Um grande número de interações célula-célula e célula-matriz é provavelmente mediada por proteínas ligantes de carboidratos ("Carbohydrate-Binding Proteins", CBPs) (WARD, 1997).

Essas CBPs podem ser lectinas, como no caso de *Entamoeba histolytica* (PETRI *et al.*, 1987), ou enzimas ligantes de carboidratos, tais como as transialidases de *T. cruzi* (MING, *et al.*, 1993). Dentre os ligantes de células hospedeiras podem incluir glicoproteínas, glicolípides ou proteoglicanas. Por outro lado, os próprios parasitas podem expressar glicoconjugados os quais medeiam a adesão através da ligação com lectinas do hospedeiro. A Tabela 1 mostra alguns protozoários parasitas e suas respectivas proteínas ligantes de carboidratos, segundo WARD (1997). Assim sendo, a transialidade poderia mediar a aderência e invasão de tripomastigota de *T. cruzi* através da ligação no ácido siálico da célula hospedeira numa interação do "tipo lectina"(MING *et al.*, 1993). Esse evento foi demonstrado usando células CHO mutantes, deficientes na síntese de ácido siálico, na qual observou-se redução na aderência e infecção, pelo *T. cruzi*, quando comparadas à infecção nas células parentais normais (SCHENKMAN *et al.*, 1993).

Em merozoítas de *Plasmodium falciparum*, durante a invasão de eritrócitos, o antígeno Pf200 ou MAS-1, pode estar mediando a adesão dos parasitas à células. Foi demonstrado que a ligação de MAS-1 à eritrócitos era abolida após tratamento com neuraminidase, glicoforina solúvel, ou com anticorpos monoclonais contra a porção do carboidrato da molécula (PERKINS & ROCCO, 1988).

a lectina, promoveu proteção completa contra abscesso hepático em 67% dos animais infectados por via intraperitoneal com *E. histolytica* (PETRI & RAVDIN, 1991). Em experimentos de aderência *in vitro*, a ligação de trofozoítas de amebas às células ovarianas de hamster chinês (CHO) foi inibida em 90 a 96% por Gal e GalNAc (RAVDIN *et al.*, 1989). Estudos mais recentes, demonstraram que a aderência *in vitro* de *E. histolytica* é inibida por galactose, N-acetil-D-glucosamina (GalNAc), melibiose e lactose (galactose  $\beta$ 1-4 glucose) (PETRI & MAN, 1993; McCOY *et al.*, 1994).

Diferentes estudos têm sugerido a presença da atividade de GlcNAc em promastigotas de *Leishmania*. Foi demonstrado que promastigotas ligadas a GlcNAc específica era inibida de ligar-se a macrófagos (HERNANDEZ *et al.*, 1986). Neoglicoproteínas e neoglicoenzimas foram utilizadas como ferramenta para identificar a atividade ligante de carboidratos na superfície de parasitas *Leishmania*. Nestes estudos, as neoglicoproteínas GlcNAc-BSA e GalNAc-BSA ligaram-se a forma promastigota mas não em amastigota (SCHOTTELIUS, 1992). Essa ligação demonstrou ser dependente de cálcio, uma vez que pôde ser bloqueada por EDTA e restaurada pela adição de cálcio. Estudos de ligação com neoglicoproteínas confirmaram esses achados e também evidenciaram a ligação específica de outros monossacarídeos e dissacarídeos incluindo ácido siálico (SCHOTTELIUS & GABIUS, 1992). Mais recentemente, foi demonstrado que promastigotas de *Leishmania* foram aglutinadas com neoglicoproteínas NAcGlc-BSA e NAcGal-BSA. Esta aglutinação foi bloqueada por galactosamina e ácido siálico, mas não por GlcNAc ou GalNAc, sugerindo que esta aglutinina poderia participar da aderência ou invasão em macrófagos (SVOBODOVA *et al.*, 1997).

### 1.1.2.1 - *Toxoplasma gondii* como modelo de estudo de mecanismo de adesão e invasão

Uma das grandes áreas de estudo de *T. gondii* concentra-se nos mecanismos de adesão e invasão do parasita às células do hospedeiro, tanto fagocíticas como não-fagocíticas. Tem sido descrito que a interação deste protozoário com a célula hospedeira resultou de um processo de seleção de um receptor ou de uma família de receptores relativamente universais para os ligantes parasitários, tornando este parasita reconhecidamente muito ubiqüitário na natureza (KASPER & MINEO, 1994).

*T. gondii* é um parasita intracelular obrigatório, capaz de invadir todas as células animais nucleadas até agora estudadas (BUCKLEY, 1973; WERK, 1989). Entretanto, não consegue sobreviver em hemácias humanas, provavelmente em função dos níveis de colesterol e fosfolípidos do plasmalema, os quais interferem na sua viscosidade (WERK, 1985) e também pela ausência do núcleo. A capacidade de invadir células filogeneticamente distantes, sugere que o mecanismo de invasão envolve um receptor celular altamente conservado (GRIMWOOD & SMITH, 1992; MINEO & KASPER, 1994).

Cepas de *T. gondii*, quando recentemente isoladas na natureza, apresentam virulência distinta da encontrada nas cepas mantidas no laboratório há muito tempo. Há aumento da virulência após repetidas passagens em animais, dependendo da espécie utilizada. A cepa RH de *T. gondii* foi obtida de tecido humano infectado e tem sido mantida em laboratório desde 1941 (SABIN, 1941).

O taquizoíta foi a primeira forma descrita do *T. gondii* por ser de reprodução rápida e encontrada mais facilmente em líquido biológicos. Em sua morfologia observa-se a presença de regiões polares sendo que um dos pólos, denominado anterior, apresenta o complexo apical composto de roptrias, micronemas, conóide, revestido por proteínas



capazes de aderir à célula hospedeiro, e o anel polar; o outro pólo, mais arredondado, geralmente apresenta o núcleo. A forma taquizoíta apresenta ainda uma película, composta por três membranas, com um arranjo sub-pelicular de microtúbulos compostos por uma rede de 22 feixes, que se juntam no conóide e envolvem toda a célula.

MINELLI (1995), isolou uma fração lectínica de *Toxoplasma gondii* que apresenta similaridades com a jacalina, que por sua vez apresenta afinidade por resíduos de galactose. Diferentes proteínas de superfície de taquizoítas de *T. gondii* estão envolvidas na adesão e invasão da célula hospedeira. Embora, nada tenha sido relatado com relação à presença de propriedade lectínica destas proteínas, existe forte evidência que, pelo menos uma delas (SAG-1-p30) contém ligantes que medeiam a ligação a receptores na superfície de células ou a moléculas da matriz extracelular (GRIMWOOD, 1996).

FURTADO *et al.* (1992) observaram que a laminina, uma molécula de adesão intercelular, favorece a adesão de taquizoítas por múltiplos sítios de ligação. Após o contato da superfície do taquizoítas com os receptores os receptores da célula hospedeira, ocorre uma reorientação do taquizoíta até que o conóide esteja aderido à superfície da célula hospedeira. No espaço entre o conóide e a membrana da célula hospedeira, o conteúdo das roptrias é extruso, sendo este capaz de modificar a membrana da célula hospedeira (AMATO NETO *et al.* 1995). Logo após a penetração, o parasita secreta vesículas membranosas, gerando na célula invadida um vacúolo parasitóforo híbrido, composto por proteínas do hospedeiro e do parasita. Esse vacúolo não é reconhecido pelos sistemas de transporte intracelular, sendo resistente à digestão e aos processos endocíticos normais (KASPER & BOOTHROYD, 1992), além de ser capaz de inibir a acidificação do fagossomo e sua fusão com os lisossomos. Como resultante destes processos, o taquizoíta consegue se evadir dos sistemas de lise do hospedeiro, podendo

proliferar. Essa divisão celular dos taquizoítas dentro do vacúolo se dá por um processo denominado endodiogenia, de onde duas células-filhas são geradas dentro das membranas da célula-mãe, resultando da divisão duas células-filhas e um corpo residual da célula-mãe. A replicação progressiva leva à ruptura da célula parasitada, permitindo que os parasitas invadam novas células, e disseminem-se, por via linfática, sangüínea ou pelas cavidades serosas, para outros órgãos e tecidos.(AMATO NETO *et al.* 1995)

### **I.1.3 - Lectinas presentes em animais vertebrados e invertebrados**

Lectinas estão presentes também nos animais vertebrados e invertebrados. No sistema imune dos vertebrados, os macrófagos apresentam lectinas que participam da fagocitose e pinocitose de organismos invasores e células sangüíneas danificadas (KERY, 1991). Macrófagos ativados possuem uma lectina específica para N-acetil-galactosamina e galactose responsável pelo reconhecimento e morte de células tumorais (HAJELA, 1991) e o epitélio do timo expressa uma lectina específica para galactose. Esta é considerada responsável por manter timócitos imaturos no córtex do timo através da ligação a resíduos de galactose presentes na superfície destas células.

Células animais possuem moléculas de adesão intercelular que são proteínas de membrana que permitem a interação de uma célula com outra (ROITT, 1993). Parece provável que interação entre endotélio e leucócitos circulantes envolva números diferentes destas moléculas. Se lectinas ou moléculas lectínicas representam um tipo dessas proteínas. Elas são moléculas transmembrânicas que possuem na região extracelular um domínio N-terminal com propriedades semelhantes a lectinas (ligam-se a resíduos de carboidrato) (ROITT, 1993).

Os invertebrados apresentam lectinas que podem estar relacionadas com o seu sistema de reconhecimento imunológico, porém, não há evidências plausíveis em relação a este papel das lectinas nesses animais. Há demonstrações convincentes apenas para os moluscos e tunicatos nos quais as lectinas medeiam reconhecimento de partículas por fagócitos (ROITT, 1992).

#### I.1.4 - Lectinas vegetais utilizadas em estudos imunológicos

As lectinas de plantas têm sido utilizadas em vários estudos imunológicos devido ao seu alto grau de especificidade por açúcares e poderem, em alguns casos, estimular células do sistema imune. Estas podem ser classificadas, baseando-se na sua capacidade em aumentar a síntese de DNA e de induzir transformação blástica em populações específicas de linfócitos em: mitogênicas, não mitogênicas ou indiferentes (KERY, 1991).

A ativação de linfócitos por lectinas mitogênicas é comparável à ativação antigênica, com conseqüente modificações morfológicas, modulação fenotípica de determinantes de superfície e liberação de citocinas e imunoglobulinas (WHISLER & YATES, 1980). Por outro lado, contrastando com a ativação antigênica, a estimulação induzida pela lectina leva à ativação policlonal das células imunes (WHISLER & YATES, 1980; MILLER *et al.*, 1982). Observações posteriores sugeriram que as lectinas mitogênicas interagem com TCR de linfócitos T, com ambas as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  e, dessa forma, transmitem sinais mitogênicos, levando a ativação policlonal nessas células (CHILSON *et al.*, 1984, LECA *et al.*, 1986, CLEVERS *et al.*, 1988).

A primeira lectina de planta com característica mitogênica a ser descoberta foi publicada a partir de *Phaseolus vulgaris*, a fitohemaglutinina (PHA), na década de 1960

(NOWELL, 1960). A partir de então, várias outras lectinas foram isoladas e caracterizadas, sendo que as mais bem definidas e amplamente utilizadas em diferentes ensaios imunológicos são: Concanavalina A (Con-A) purificada de *Canavalia ensiformis*, o mitógeno do "pokeweed" (Pokeweed mitogen, PWM), isolada de *Phytolacca americana*, e a aglutinina extraída do germe de trigo (Wheat germ agglutinin, WGA), isolada de *Triticum vulgare*. Essas lectinas, desempenham diferentes efeitos biológicos sobre populações de linfócitos (PEACOCK *et al.*, 1990).

No que diz respeito às lectinas vegetais, aquelas extraídas das sementes de *Artocarpus integrifolia* foram objetos de vários estudos, dentre eles, aqueles que inicialmente visavam utilizar essas lectinas como elementos discriminadores de formas de crescimento de *Trypanosoma cruzi* (PEREIRA, *et al.*, 1986) e como substância ativadora de linfócitos humanos (BUNN-MORENO & CAMPOS-NETO, 1981). MOREIRA & AINOZ (1981), constataram a presença de lectinas nesse extrato, devido a sua capacidade de aglutinar eritrócitos de diferentes animais. Essa lectina, denominada jacalina, foi inicialmente purificada e caracterizada por dois grupos independentes (MOREIRA & AINOZ, 1981; SURESHKUMAR *et al.*, 1982). A análise por cromatografia, em coluna Con-A-Sepharose, revelou que a jacalina era uma glicoproteína (SURESHKUMAR *et al.*, 1982). Posteriormente, APPUKUTTAN & BASU (1985) sugeriram que esta lectina seria um tetrâmero que tem apenas dois sítios de ligação glicídica, pois a eletroforese em SDS-PAGE revelou uma fração de jacalina correspondente a 10,5 kDa. Neste mesmo estudo, foi demonstrado ainda que os resíduos de tirosina e lisina fazem parte do sítio de ligação da lectina. ROQUE-BARREIRA & CAMPOS-NETO (1985) observaram que nas culturas que continham jacalina ocorria a formação de um precipitado, cuja intensidade era proporcional à concentração da lectina. A hipótese de que proteínas do soro humano, adicionadas a meio de cultura, estivessem

sendo precipitadas pela jacalina foi testada, e constataram que a jacalina interagia com IgA e não se ligava à IgG, IgM ou IgE. Esta observação fundamentou a proposição de um método de alta resolução para a purificação de IgA sérica e secretória.

Estudos que comprovaram a propriedade da jacalina em estimular a produção de IFN- $\gamma$  em culturas de linfócito T humano *in vitro*, levaram outros estudiosos a produzirem hibridomas de célula T secretores de IFN- $\gamma$  (CRANE *et al.*, 1984). Os hibridomas foram produzidos a partir da fusão de linfócitos T estimulados pela jacalina com uma linhagem de célula T não secretora de IFN- $\gamma$  (SH9).

Relatos mais recentes descreveram uma lectina, denominada UDA, extraída de rizomas da planta *Urtica dioica* que apresenta importante papel na defesa da plântula contra fungos patogênicos (GALELLI & TRUFFA-BACHI, 1993). UDA estimula a proliferação de células T. Sua atividade mitogênica se deve à sua capacidade de se ligar ao carboidrato N,N',N''-Triacetylchitotriose.

As lectinas atuam não somente em populações de células T e B. Em estudos *in vitro*, MALDONADO *et al.* (1994) constataram que lectinas específicas para resíduos de glicose, manose e lactose aumentam a atividade fagocítica de macrófagos peritoneais de camundongo. Neste mesmo estudo, aglutinina de amendoim (PNA), uma lectina específica para ligação a resíduos de galactose, diminuiu a atividade fagocítica desses macrófagos.

Algumas lectinas possuem atividade citotóxica para células eucarióticas. A ricina é uma proteína de peso molecular 64 kDa extraída de sementes de *Ricinus communis* (MOOLTEN *et al.*, 1976). Esta proteína apresenta uma porção com propriedade lectínica - cadeia B - e outra tóxica - cadeia A - interligadas por ponte dissulfeto. A cadeia B reconhece e se liga a receptores celulares contendo galactose e promove a entrada da cadeia A para o citoplasma das células. No interior celular, a

cadeia A exerce seu efeito citotóxico inibindo a síntese de proteínas por inativar a subunidade 60S ribossomal (TEIXEIRA & SANTANA, 1990; ENDO *et al.*, 1987)

A ricina e outras toxinas de plantas ou toxinas bacterianas, como a toxina diftérica, não apresentam especificidade para um determinado tipo celular, ligando-se portanto a qualquer tipo de célula que possui seu sítio de ligação específico. Para contornar esta ausência de tropismo, muitos estudos foram feitos conjugando toxinas com anticorpos monoclonais (THORPE *et al.*, 1978; THORPE, 1988). Neste caso, os anticorpos realizam a função de direcionar as toxinas com mais eficiência direcionando-se às células alvo.

Toxinas assim conjugadas com anticorpos, constituem as chamadas imunotoxinas, que são agentes citotóxicos eficientes para matar células alvo dos anticorpos.

Muitos experimentos são realizados com imunotoxinas. YOULE & NEVILLE (1980), conjugaram a ricina com anticorpo monoclonal (MAb) contra o antígeno Thy 1.2 e observaram que este conjugado é capaz de inibir a síntese de proteínas nas células leucêmicas que apresentam o antígeno Thy 1.2. Estudos *in vitro* foram realizados com cadeia A da ricina conjugada a anticorpos monoclonais anti-células de câncer de mama humano (RAMAKSISHNAN, 1989). Uma linhagem de célula tumoral (BCL1) tratada com cadeia A da ricina conjugada a anticorpo monoclonal não se desenvolveu em camundongos BALB/c (KROLICK *et al.*, 1982).

Outras toxinas como a saponina, foram utilizadas na construção de imunotoxinas. A saponina é uma proteína de peso molecular 30 kDa, extraída da planta *Saponaria officinalis*. É uma toxina de cadeia simples, não apresentando portanto a cadeia ligante. Sua cadeia única possui atividade semelhante à cadeia A da ricina que mata células eucarióticas inibindo a síntese de proteínas (PICKLO *et al.*, 1995).

Imunotoxinas construídas pela conjugação de saponina com anticorpos monoclonais anti-dopamina  $\beta$ -hidrosilase (DBH), mostraram habilidade em destruir neurônios do gânglio cervical superior de ratos adultos (PICKLO *et al.*, 1994). Além dessas aplicações há relatos de estudos direcionando imunotoxinas a populações de células T para prevenir a rejeição de órgãos transplantados e contra células CD4 infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana - HIV (THRUSH *et al.*, 1996).

Nota-se, portanto, uma ampla variedade de lectinas conhecidas e inúmeras são as suas aplicações no campo da ciência. Assim, constata-se aqui a importância de se verificar a presença de propriedade lectínica em proteínas de planta que até o presente momento não foram relatadas na literatura. O presente trabalho teve como objetivo a análise da atividade lectínica de extratos de *Caryocar brasiliensis*.

## II - OBJETIVOS

- Isolar e caracterizar as proteínas do extrato do endocarpo de *Caryocar brasiliensis*.
- Analisar a presença de propriedade aglutinante dos extratos protéicos do endocarpo de *C. brasiliensis*, através da técnica de hemaglutinação ativa.
- Analisar em cultura de células a capacidade de macrófagos peritoneais ativados em estimular a produção de óxido nítrico na presença do extrato de *C. brasiliensis*.
- Avaliar a presença de efeitos tóxicos do extrato de *C. brasiliensis* sobre células eucarióticas, mensurando-se atividade lítica em culturas de células ou em modelo *in vivo*.
- Analisar a presença de atividade *in vivo* e *in vitro* de *C. brasiliensis* sobre o citoesqueleto de *Toxoplasma gondii*, com interferência nos mecanismos de adesão e invasão desta parasita à célula hospedeira.



### III - MATERIAL E MÉTODOS

#### III.1 - Obtenção do extrato protéico.

Foi utilizado o fruto de *Caryocar brasiliensis* (pequi) com o propósito de analisar a presença de atividade lectínica em seus extratos.

##### III.1.1 - *Caryocar brasiliensis*

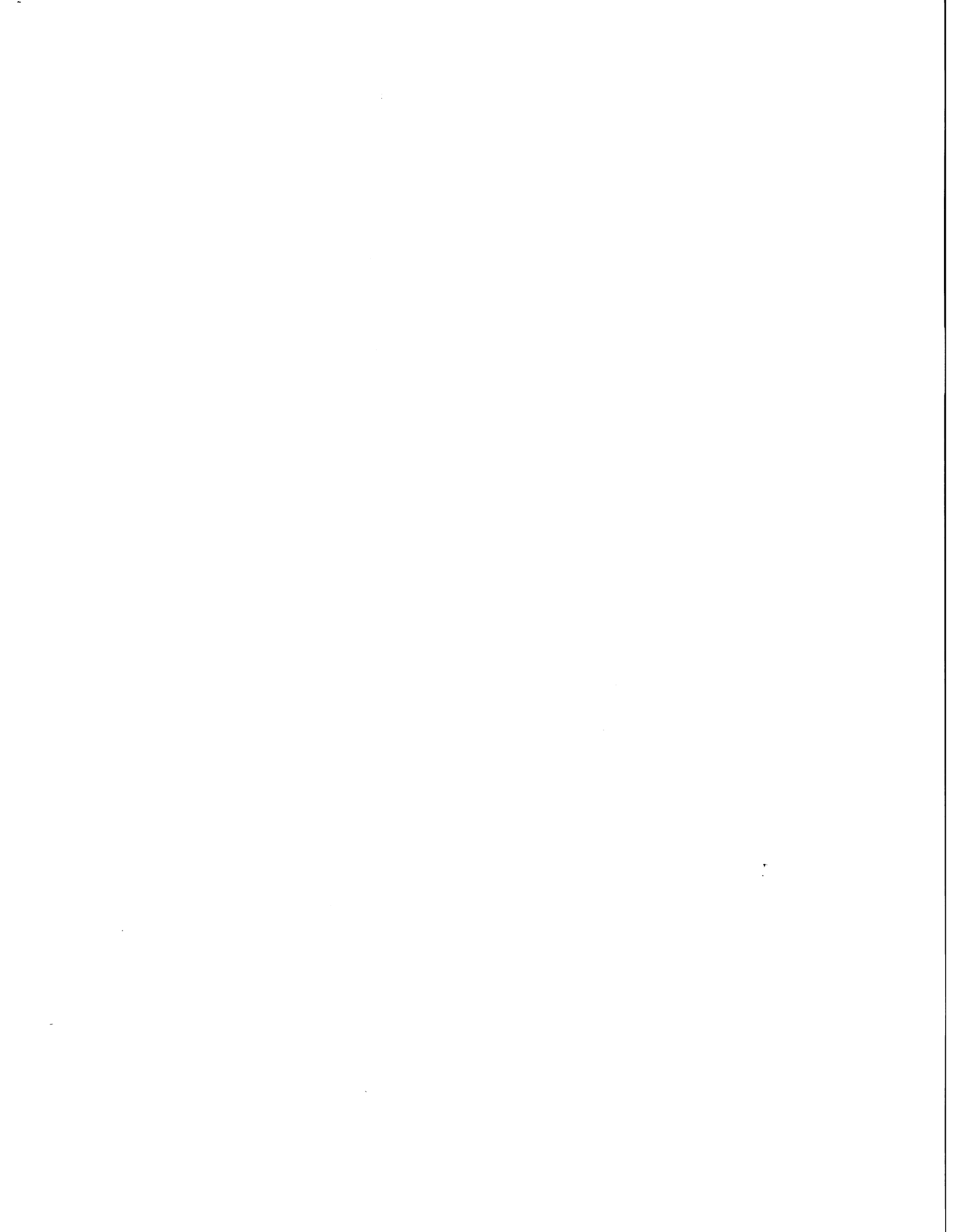
Amostras das várias partes dos frutos de *C. brasiliensis*, a saber epicarpo, mesocarpo, endocarpo e semente (Figura 1) foram colocadas separadamente em recipientes de vidro, contendo éter etílico para deslipidação (Cinética Química, S.P.), sob agitação vigorosa, durante 24 horas, até que ocorra a completa evaporação do solvente.

Após esse período, o material obtido foi pesado e adicionado a cada 5 g de massa, 15 ml de salina tamponada com fosfato 0,15 M, pH 7,2 (PBS) contendo 0,5 % de fenol (Merck, Rio de Janeiro). Posteriormente, foram triturados em liquidificador e incubados a 4°C, por 48 horas sob agitação suave. A mistura foi em seguida distribuída em tubos e submetidos à centrifugação sob refrigeração (Eppendorf, Hamburg, Germany) a 1620 g, durante dois períodos de 30 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram colhidos e novamente centrifugados a 13000 g por 20 minutos a 4°C.

Os sobrenadantes obtidos foram filtrados em membrana clarificante e dialisados contra PBS, durante 48 horas a 4°C, sendo realizadas três trocas nesse período. Ao fim da diálise, a amostra foi dividida em aliquotas e armazenada a -20°C.







### III.2 - Análise dos extratos protéicos de *Caryocar brasiliensis*.

Amostras dos extratos foram submetidas a dosagem protéica, determinada pelo método de LOWRY (1951). O extrato endocárpico foi também submetido a dosagem de polissacárides pelo método de ANTRONA (SCOTT, T.A & MELVIN, E. H., 1953).

### III.3 - SDS-PAGE

Para analisar o perfil das proteínas dos extratos protéicos, amostra de cada extrato foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 15 % em sistema de tampões descontínuos, segundo LAEMMLI (1970). Após a migração eletroforética das proteínas, o gel foi corado pela prata segundo o método descrito por FRIEDMAN (1982).

Para preparação do gel de separação, foram utilizadas as seguintes soluções: Tris-HCl 0,375 M pH 8,8, SDS (sulfato dodecil de sódio) 0,1 %, ácido etileno diamino tetra acético (EDTA) 2 mM, N,N,N,N - tetrametil etileno diamino (TEMED) 0,125%, persulfato de amônio (APS) 0,125% e Acrilamida: Bisacrilamida na proporção de 30:0,8, respectivamente, no volume desejado para se obter o gel na concentração de 15%.

O gel de empilhamento foi preparado utilizando-se as soluções: Tris-HCl 0,125 M pH 6,8, SDS 0,1%, EDTA 2 mM, TEMED 0,125%, APS 0,125% e Acrilamida:Bisacrilamida 5%. Estes reagentes foram obtidos dos seguintes fornecedores: Tris (Hydroxymethyl aminomethane) e SDS (Sigma Chem. Co, St. Louis - MO, USA),

EDTA (Quimibrás Ind. químicas AS. Rio de Janeiro - RJ) Bisacrilamida, TEMED e APS (Pharmacia - LKB, Produtos AB, Bromma, Suécia).

As placas foram montadas em cubas para eletroforese contendo o tampão eletrodo (Tris-glicina 0,025 M pH 8,3).

Amostras foram diluídas separadamente na razão de 1:1 (V/V) em tampão de amostra [(0,1 mM Tris pH 6,8, 4% SDS, 0,2% azul de bromofenol (Sigma Chem Co, St. Louis - MO, USA), 20% glicerol)], sem  $\beta$ -mercaptoetanol, e submetidas a um aquecimento de 100°C em banho-maria durante 3 minutos. As amostras assim preparadas foram aplicadas separadamente em poços do gel (15  $\mu$ l/poço).

Como controle foram utilizadas proteínas de referência, com pesos moleculares conhecidos, a saber: fosforilase b (97 kDa); soroalbumina bovina (67 kDa); desidrogenase glutâmica (55 kDa); ovoalbumina (45 kDa); anidrase carbônica (29 kDa); tripsinogênio (24 kDa); inibidor de tripsina (20 kDa);  $\alpha$ -lactalbumina (14 kDa). A eletroforese foi realizada sob corrente constante de 10mA, por aproximadamente 2 horas e 30 minutos, utilizando-se fonte 2301 Macrodrive 1 LKB Pharmacia (Bromma, Sweden).

### III.3.1- Método de coloração pela prata

Ao término da eletroforese, o gel foi fixado em uma solução preparada com água destilada a 50% de metanol (Synth, Diadema, S.P.) 12% de ácido acético (Rioquímica, S.J. do Rio Preto, S.P.) e 50 ~~ml~~ <sup>$\mu$ l</sup> de formol (Vetec, Rio de Janeiro, R.J).

Após a fixação, o gel foi lavado três vezes em 50% de etanol (Vetec) por vinte minutos, sendo o pré-tratamento, efetuado com tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot \text{SH}_2\text{O}$ , Synth, Diadema, S.P.) a 0,1 g em 500 ~~ml~~ <sup>$\mu$ l</sup> durante um minuto. O gel foi novamente lavado

por três vezes com H<sub>2</sub>O bidestilada, durante vinte segundos. Em seguida, foi impregnado pela prata (AgNO<sub>3</sub> Merck) durante 20 minutos e por fim a revelação aconteceu com a solução de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Ecibra, Ind, Brasileira) 6,0 g em 100 ml de água destilada e 50 ml de formol 37%, acrescido de 2 ml da solução de tiosulfato de sódio, até que apareça a cor. Quando o gel corou, a reação foi parada com solução de 50% de metanol e 12% de ácido acético, e em seguida foi fixado.

O peso molecular das proteínas visualizadas foi calculado traçando-se uma reta de regressão linear e relacionando-se o índice de migração (Rf) destas proteínas com aquelas de pesos moleculares conhecidos.

### **III.4 - Reação de hemaglutinação**

#### **III.4.1 - Obtenção das hemácias**

Hemácias de diferentes espécies, a saber, humanas, de carneiro, e de diferentes linhagens de camundongos: BALB/c, C57Bl/6, DBA/2, NZW e NZB/W, foram obtidas por punção venosa na presença do anti-coagulante citrato de sódio a 2% (Reagen, Rio de Janeiro, R.J.). Posteriormente, foi efetuada a lavagem das hemácias por centrifugação com PBS e feito o ajuste para a concentração de 1% em PBS para utilização nas reações de hemaglutinação.

#### **III.4.2 – Ensaio de hemaglutinação**

Diluições dos extratos de *Caryocar brasiliensis* foram submetidas a reação de hemaglutinação ativa. As reações foram feitas em placas de microtitulação de 96 poços

fundo em "U", utilizando-se hemácias dos camundongos: BALB/c, C57Bl/6, DBA/2, NZW e NZB/W. Os diferentes tipos de hemácias foram diluídas a 1% em PBS, sendo que 25 µl desta solução foi adicionada aos poços da placa contendo 50 µl do extrato protéico nas concentrações de 151,3 µg/ml, 30,3 µg/ml, 6,1 µg/ml, 1,2 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,05 µg/ml, 0,01 µg/ml e 0,002 µg/ml. O controle das hemácias consistiu de 50 µl de PBS e 25 µl da solução de hemácias a 1 %.

As placas foram mantidas à temperatura ambiente, por 2 horas e a leitura efetuada em negatoscópio, onde a presença de hemaglutinação foi avaliada pelo padrão do sedimento, que apresentou a forma de um botão nas reações negativas (-) e de um tapete circular de bordos irregulares nas reações fortemente positivas (+).

### III.5 - Cultura de células

A análise em cultura de células foi realizada com o propósito de se avaliar a capacidade de macrófagos peritoneais, obtidos de diferentes linhagens de camundongos, em estimular a produção de óxido nítrico (NO) 48 horas, quando cultivados em presença do extrato do endocarpo de *C. brasiliensis*.

Várias precauções foram seguidas no manuseio das culturas celulares para que não ocorresse o insucesso dos experimentos devido a contaminações. Sendo a água o componente fundamental dos meios de cultura, foi tratada por destilação, bidestilação, deionização e desmineralização. Antes de serem utilizadas, todas as soluções ou meios de culturas foram esterilizados por filtração e testados quanto à presença de fungos ou de bactérias contaminantes. Demais componentes utilizados na cultura foram esterilizados, com a finalidade de destruir os microorganismos presentes, sob a forma vegetativa, ou sob a forma esporulada, em autoclave por calor úmido.



### III.5.1- Macrófagos

Macrófagos peritoneais ativados foram obtidos de camundongos: BALB/c, C57Bl/6, DBA/2, NZW e NZB/W normais, após estimulação com tioglicolato de sódio a 3%. Após três dias, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, os macrófagos ativados colhidos da cavidade peritoneal e lavados separadamente uma vez em PBS estéril gelado, por centrifugação a 405 g durante 10 minutos. As células foram diluídas na razão de 1/2 em solução de azul Trypan a 0,4% (Sigma) contadas em câmara de Neubauer e a concentração ajustada de modo a conter  $2 \times 10^6$  células por ml de meio mínimo modificado de Dulbecco adicionado a 10% de soro fetal bovino e dos antibióticos: Streptomicina, Penicilina e Anfotericina (DMEM completo). As suspensões celulares foram distribuídas separadamente em duplicata, em placas de cultura de 96 poços e cultivadas a 37°C por 48 horas, em estufa umificada contendo ar mais 5% de CO<sub>2</sub>, na presença dos estímulos: LPS (Sigma) a 50 µg/ml, LPS a 50 µg/ml + IFN-γ (Pharmingen, San Diego, CA) 100 U, IFN-γ 100 U, Con-A (Sigma) a 5 µg/ml e o extrato do endocarpo de *C. brasiliensis* na concentração de 75,6 µg/ml. Os sobrenadantes após esse período, foram coletados e analisados quanto a dosagem de NO.

### III.6- Dosagem de óxido nítrico (NO)

Placas de poliestireno de 96 poços foram utilizadas na dosagem do NO segundo o método de Griess (GREN *et. al*, 1982). As amostras testes não diluídas e as diluições da curva padrão foram adicionadas num volume de 50 µl por poço. A curva padrão de NO foi feita com uma concentração inicial de 200 µM e em 11 diluições

seriadas subsequentes com fator de diluição 2, até a concentração final de 0,195  $\mu$ M. As amostras testes e as da curva padrão foram, a seguir, incubadas com o reagente de Griess. O reagente de Griess consistiu de uma solução de 2,5 ml de NEED (naftiletinodiamina dihidroclorato) a 0,1% e 2,5 ml de sulfamilamida (Sigma) a 1% em H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2,5% em água destilada. Os reagentes foram misturados no momento do uso, sendo retirado o ar do frasco neste período. A reação colorimétrica ocorreu imediatamente após a coloração do reagente de Griess e a leitura foi efetuada em leitor de microplacas (Titertek Multiskan II-PLUS) a 570 nm.

### III.7 – Efeito da atividade biológica do extrato endocárpico de *C. brasiliensis* sobre hemácias, macrófagos murinos e clone E-9 proveniente de hibridoma murino.

O estudo das atividades biológicas do extrato endocárpico de *C. brasiliensis*, particularmente as atividades lectínicas ou hemolítica, foi realizado frente a suspensões de hemácias, macrófagos peritoneais murinos e clone E-9. Ao término de cada um destes experimentos, procedeu-se a uma análise da viabilidade destas células após tratamento com diferentes concentrações de endocarpo de *Caryocar brasiliensis*, por um período de 2 horas à temperatura ambiente.

#### III.7.1 – Hemácias murinas

Hemácias de camundongos BALB/c foram obtidas a partir de amostras de sangue coletadas diretamente do plexo orbital, em capilares de vidro contendo citrato de sódio a 2%. As suspensões de hemácias foram lavadas por centrifugação com salina a 0,85% (SF), ajustando-se a concentração para 1% em PBS. Em seguida, 25  $\mu$ l desta

suspensão foi adicionada aos orifícios da placa de poliestireno contendo 50 µl do extrato protéico nas concentrações de 151,3 µg/ml, 30,3 µg/ml, 6,1 µg/ml, 1,2 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,05 µg/ml, 0,01 µg/ml e 0,002 µg/ml. O controle das hemácias foi constituído de orifícios das placas contendo 50 µl de PBS e 25 µl da solução de hemácias a 1 %. As placas foram mantidas à temperatura ambiente por um período de 2 horas. Após esta incubação, as suspensões de hemácias foram transferidas para lâminas de vidro para serem analisadas em microscopia de luz quanto a percentagem de viabilidade.

### III.7.2 – Macrófagos peritoneais

Macrófagos obtidos de camundongos BALB/c, foram colhidos da cavidade peritoneal e lavados uma vez em PBS 0,15 M, por centrifugação a 405 g durante 10 minutos. Após a lavagem, alíquotas de 100 µl de suspensões contendo  $2 \times 10^6$  células por ml foram adicionadas sobre lamínulas de vidro que estavam acondicionadas em placas plásticas de 6 orifícios. Adicionou-se em seguida volumes de 100 µl do extrato protéico de *C. brasiliensis*, nas concentrações de 756,6 µg/ml, 378,3 µg/ml, 189,15 µg/ml, 94,6 µg/ml ou 47,3 µg/ml sobre cada lamínula. Como controle, volumes de 100 µl de PBS foram adicionados a outras lamínulas contendo suspensões de células macrofágicas.

### III.7.3 - Clone E-9

Suspensões celulares do clone E-9, obtido a partir de hibridoma murino produzido a partir de células provenientes de camundongos BALB/c, foram coletadas de cultura e lavadas uma vez com DMEM incompleto, por centrifugação a 405 g durante

cinco minutos. Após a lavagem, alíquotas de 100 µl ( $2 \times 10^6$  células/ml) desta suspensão foram adicionadas em cada um dos 6 poços da placa contendo: 100 µl de PBS como controle ou 100 µl do extrato protéico de *C. brasiliensis*, nas concentrações de 756,6 µg/ml, 378,3 µg/ml, 189,15 µg/ml, 94,6 µg/ml ou 47,3 µg/ml.

**III.8** - Efeito da adição do extrato de *C. brasiliensis* sobre suspensões de formas taquizoítas de *T. gondii*.

O extrato de *C. brasiliensis*, foi adicionado a suspensões de formas taquizoítas de *T. gondii* com o objetivo de verificar possíveis efeitos sobre os parasitas, como aglutinação e modificações nas percentagens de viabilidade dos parasitas após incubação de duas horas com o extrato vegetal.

Inicialmente, os parasitas da cepa RH foram coletados do exsudato peritoneal de camundongos BALB/c. Em seguida, estas suspensões parasitárias foram lavadas três vezes, durante cinco minutos por ciclo em lavagem em PBS. Ao término das lavagens, os parasitas foram diluídos na razão de 1/2 em azul Trypan a 0,4% (Sigma) e contados em câmara de Neubauer.

Num segundo momento, foram separados seis tubos tipo Eppendorf contendo cada um 100 µl de *T. gondii* ( $10^8$  parasitas). Ao primeiro, correspondendo ao controle, foi adicionado 100 µl de PBS, sendo que no segundo foi adicionado 100 µl de extrato vegetal a 756,6 µg/ml, diluído em PBS 0,15 M, e do terceiro ao sexto tubo foi adicionado 100 µl do extrato em diluições seriadas na razão 1/2, variando de 378,3 µg/ml a 47,3 µg/ml. Após incubação de duas horas a temperatura ambiente, as amostras foram coradas com Fluoro-Quench AO/EB e observadas em microscópio de fluorescência.

### III.9 - Efeito da atividade de *C. brasiliensis* sobre *T. gondii*.

A análise da atividade de *C. brasiliensis in vivo* quando incubado na presença do *T. gondii* foi realizada em camundongos BALB/c com o propósito de avaliar a capacidade do parasita na invasão celular. Na análise *in vitro* foram utilizados, enterócitos de ratos (IEC) e macrófagos murinos peritoneais e de linhagem (J774), para analisar o processo de invasão do parasita nestas células, bem como em eritrócitos murinos para determinação da viabilidade do parasita.

Para realização destes experimentos foram utilizadas amostras da cepa RH de *T. gondii* ( $10^8$  parasitas) e extrato endocárpico de *Caryocar brasiliensis* nas concentrações de 756,6 µg/ml, 378,3 µg/ml, 189,15 µg/ml, 94,6 µg/ml e 47,3 µg/ml. Essas amostras foram separadas em seis tubos tipo Eppendorf. Ao primeiro, correspondendo ao controle, 100 µl de PBS foram adicionados a 100 µl da suspensão parasitária. Ao segundo tubo, denominado de puro, 100 µl da suspensão parasitária foram adicionados a 100 µl de extrato de *C. brasiliensis* a 756,6 µg/ml. Do terceiro ao sexto tubo, adicionou-se à suspensão de parasitas 100 µl do extrato contendo diluições seriadas, na razão  $\frac{1}{2}$ , contendo, respectivamente, de 378,3 µg/ml a 47,3 µg/ml. Estas preparações foram mantidas em incubação à temperatura ambiente durante um período de duas horas.

#### III.9.1 - Camundongos BALB/c inoculados com *T. gondii* tratados ou não com extrato do endocarpo de *C. brasiliensis*.

Após o período de incubação das amostras de *T. gondii* e extrato de *C. brasiliensis*, como descrito anteriormente, foram separados cinco grupos de animais

contendo cada um dois camundongos da linhagem BALB/c. Os animais foram inoculados com 100 µl da amostra correspondente ao respectivo grupo e mantidos em observação por um período de 30 dias.

Durante este período, os camundongos foram sangrados nos intervalos de 7, 14 e 21 dias pelo plexo orbital, e as amostras de soros foram mantidas a -20 C até serem testadas pelo ensaio imunoenzimático ELISA para a detecção de anticorpos anti-*T. gondii* produzidos por estes animais durante o período de observação.

### III.9.2 - Análise da capacidade de invasão celular de *T. gondii* tratados com extrato endocárpico de *Caryocar brasiliensis*.

Para determinação da capacidade de invasão de *T. gondii*, foi realizada estimulação de macrófagos, obtidos de camundongos BALB/c, com tioglicolato de sódio a 3% por 96 horas. Após este período, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os macrófagos peritoneais ativados foram colhidos com PBS estéril. Este material foi imediatamente centrifugado a 405 g durante 10 minutos e ressuspensão em 6 ml de meio de cultura DMEM completo.

Placas de cultura de 6 poços contendo uma lamínula de vidro em cada poço, foram esterilizadas em duplicata, adicionado-se em seguida 500 µl da suspensão de macrófagos, contendo  $10^6$  células, nos poços durante duas horas a 37°C para permitir a aderência das células às lamínulas. Ao término deste período, foram adicionados 100 µl das amostras de *C. brasiliensis* nas diferentes concentrações como descritas anteriormente. Adicionou-se a seguir taquizoítas de *T. gondii* a essas células, na proporção 10 parasitas para cada célula hospedeira. Estas preparações foram mantidas em incubação a 37°C por duas horas, para permitir a aderência e invasão dos parasitas às

células hospedeiras. As placas foram lavadas em PBS estéril após este período, para retirada dos parasitas não aderidos e/ou internalizados. Para fixação destas preparações, adicionou-se 1 ml de acetona comercial gelada sobre as lamínulas, mantendo-as a seguir a 4°C por toda a noite. No dia seguinte, estas preparações foram lavadas uma vez em PBS estéril e uma vez em água destilada. Em seguida foi adicionado 1 ml em cada poço de solução de 5% de gelatina P.A. em PBS contendo 10 mM de azida sódica (PGN) por 15 minutos, para que fosse promovido a hidratação das células. Após este período as lamínulas foram coradas com Giemsa e observadas em microscopia de luz.

O mesmo procedimento foi realizado com macrófagos da linhagem J774 e enterócitos de ratos (IEC), com relação ao período de incubação destas células em lamínulas para aderência, ao período de incubação com o parasita para promover a invasão, a fixação com acetona e a coloração do material pelo método de Giemsa.

### III.9.3 - Análise da viabilidade do *T. gondii* em eritrócitos murinos após tratamento com endocarpo de *C. brasiliensis*.

Hemácias murinas foram utilizadas juntamente com amostras de *T. gondii* adicionado ou não com endocarpo de *C. brasiliensis*, como descrito anteriormente, para a determinação da viabilidade do *T. gondii* após o período de duas horas de incubação com o extrato vegetal.

Num primeiro momento, três camundongos BALB/c foram sangrados diretamente no plexo orbital por meio de capilar de vidro contendo citrato de sódio a 2%. Posteriormente foi efetuada a lavagem das hemácias com PBS, por centrifugação de 500 g durante 5 minutos e em seguida feito o ajuste de sua concentração para 5% em PBS.

a 37° C durante 45 minutos. Após incubação, foram retiradas as amostras e as placas lavadas quatro vezes, cinco minutos cada ciclo com PBS T. Em seguida adicionou-se um volume de 50 µl por poço do conjugado IgG de cabra anti-IgG de camundongo marcada com peroxidase na diluição 1/2000 em PBS T. Novamente as placas foram incubadas a 37°C por 45 minutos em câmara úmida e as lavagens repetidas para aplicação de 50 µl do substrato enzimático para que as reações fossem reveladas. Este substrato consistiu de solução contendo 5 mg de ortofenilenodiamina (OPD), diluído em 12,5 ml de tampão citrato-fosfato pH 5,0 e 5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. O substrato foi incubado por 15 minutos à temperatura ambiente em câmara escura.

A reação enzimática foi interrompida adicionando-se aos poços 25 µl de solução de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 2 N e a leitura das placas foram realizadas a 492 nm em leitor de microplacas (Titertek Multiskan II-PLUS, Flow, USA).

### III.11 – Análise da atividade hemolítica indireta de *C. brasiliensis*

A análise da atividade hemolítica de *C. brasiliensis*, foi desenvolvida em meio semi-sólido de agarose, com objetivo de se verificar a presença e a capacidade de fosfolipases presentes no extrato vegetal em reagir com fosfolípidos da gema de ovo, resultando na ruptura das hemácias no gel.

Numa primeira etapa, foi selecionado o painel das amostras a serem analisadas, consistindo de: controles negativos, PBS e dialisado fenólico contra PBS; controle positivo correspondendo a 10 µg e 5 µg de veneno de *Bothrops moojeni*; e as diferentes concentrações do endocarpo de *C. brasiliensis*, de 75 µg, 37,5 µg, 18,75 µg e 9,37 µg. Todas as amostras foram diluídas em PBS e conservadas a 4°C até serem utilizadas.



Na segunda etapa, amostra de sangue humano foi colhido por punção intravenosa e lavado três vezes com PBS para obtenção de papa de hemácias. Em seguida, placas de vidro 12 cm x 10 cm foram preparadas cada uma contendo 12 ml de ágar nobre a 0,8% (Difco), mantidos em banho a 46°C, acrescidos de gema de ovo a 0,5% e papa de hemácias na concentração final de 5%. As placas preparadas, foram divididas em três grupos: controle (agarose/gema de ovo/hemácias); contendo  $\beta$ -mercaptoetanol nas concentrações de 0,05% ou 0,1% ou EDTA nas molaridades de 10 mM e 50 mM respectivamente. As diferentes soluções foram solidificadas sobre placas de vidro e mantidas durante 10 minutos a 4°C. Após a solidificação, foram escavados doze orifícios de 0,4 cm de diâmetro a uma distância de aproximadamente 1,8 cm entre eles e com capacidade para 10  $\mu$ l de amostra. Na placa controle 1 e nas placas contendo  $\beta$ -mercaptoetanol ou EDTA, as amostras foram mantidas a 4°C, até aplicação no gel, enquanto a placa controle 2 recebeu amostras que foram aquecidas a 100°C, durante cinco minutos, antes da aplicação no gel. Em seguida, as placas foram incubadas em câmara úmida a 37°C e observadas a cada 60 minutos.

### III.12 – Efeito da atividade enterotóxica do extrato endocárpico de *C. brasiliensis*

O efeito enterotóxico do endocarpo de *C. brasiliensis* foi investigado por inoculação intragástrica de filhotes de camundongos BALB/c com 3 a 4 dias de idade. Para determinação desta toxicidade, um grupo de cinco animais recebeu uma dose de 35  $\mu$ g do extrato de *C. brasiliensis*, por animal, diluído em 100  $\mu$ l de azul de Trypan e o efeito promovido pelo extrato vegetal foi avaliado após três horas da inoculação. Um grupo de cinco animais, pertencentes ao grupo controle, recebeu 50  $\mu$ l de PBS adicionado a 50  $\mu$ l de azul de Trypan. Após o período estipulado, os animais foram sacrificados com

éter, determinando-se as massas totais de cada animal. Em seguida, retirou-se os estômagos e intestinos, determinando-se suas respectivas massas, expressas em gramas, separadamente da carcaça. Foram também mensuradas as massas da carcaça de cada animal. O índice de enterotoxicidade (IT) foi calculado pelo quociente entre as médias dos valores obtidos na determinação das massas intestinal e da carcaça. Uma variação maior que 0,01 no IT foi considerado significativo.

### III.13 - Análise da atividade proteolítica do extrato endocárpico de *C. brasiliensis*

A determinação da atividade proteolítica do extrato endocárpico de *C. brasiliensis* foi realizada em SDS-PAGE, utilizando-se gel de poliacrilamida a 15% e 10%, contendo gelatina a 0,5 mg/ml como substrato protéico.

Para a preparação do gel de separação, foram utilizadas as seguintes soluções: Tris HCl 1,875 M pH8,8, SDS 1%, gelatina 5 mg/ml, APS 10%, TEMED e acrilamida 30% adicionada bisacrilamida 0,8%. O gel de empilhamento foi preparado conforme o protocolo anteriormente mencionado, sem modificações. As placas foram montadas em cubas para eletroforese contendo tampão eletrodo (Tris-glicina 0,025 M pH 8,3).

Amostras do extrato vegetal foram diluídas separadamente na razão de 1:1 em tampão de amostra, sem  $\beta$ -mercaptoetanol, e não submetidas a aquecimento. As amostras assim preparadas foram aplicadas separadamente, 15  $\mu$ l/poço. Após a separação eletroforética, o gel foi incubado por 2 ciclos de 30 minutos, sob agitação lenta, à temperatura ambiente, em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0, contendo 2,5% de Triton X-100 e 10 mM de DTT. Em seguida, o gel foi mantido por 60 minutos em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 5,0, trocado o tampão e incubado no mesmo por uma

noite. A gel foi, então, corado com Coomassie Blue por 1 hora e descorado com solução de 50% de metanol e 12% de ácido acético a cada 30 minutos.

### III.14 - Efeito do extrato endocárpico de *C. brasiliensis* sobre o citoesqueleto de *Toxoplasma gondii*.

O objetivo dos experimentos realizados com taquizoítas de *T. gondii* incubados na presença do extrato do endocarpo de *C. brasiliensis*, foi analisar as possíveis mudanças ocorridas no citoesqueleto destes parasitas após um período de incubação de duas horas à temperatura ambiente.

Num primeiro momento, foram colhidas as formas taquizoítas de *T. gondii* em exsudato peritoneal de camundongos Swiss infectados com a cepa RH foi colhido e centrifugado por 15 minutos a 500 g. Em seguida esta preparação foi lavada em 12 ml de PBS estéril, centrifugados novamente a 500 g a 4°C durante 10 minutos, sendo este ciclo repetido por 3 vezes. Realizou-se a contagem dos parasitas em câmara de Neubauer e estes foram ressuspensos para uma concentração de  $10^8$  taquizoítas para cada ml de PBS estéril.

A seguir as suspensões de parasitas foram separadas em três tubos tipo Eppendorf, sendo o primeiro, correspondente ao controle, contendo 100 µl de taquizoítas de *T. gondii*, adicionado a 100 µl de PBS estéril, o segundo contendo 100 µl de taquizoítas de *T. gondii*, adicionado a 100 µl do extrato do endocarpo de *C. brasiliensis* a 756,6 µg/ml e ao terceiro tubo foi adicionado 100 µl de taquizoítas de *T. gondii* com 100 µl do extrato a 378,3 µg/ml. Após a preparação das amostras, estas foram incubadas à temperatura ambiente por um período de duas horas.

Ao término da incubação foram preparadas seis telas de cobre recobertas com formvar dicloroetano (Sigma) a 0,8% com 100 µl de cada amostra em duplicata. Após 20 minutos, as telas foram secas em papel de filtro e imediatamente colocadas em solução PHEM (60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA e 2 mM MgCl<sub>2</sub>, Sigma) por 5 minutos. Em seguida foram colocadas em Triton X-100 5% (Sigma) diluído em PHEM durante 5 minutos. Novamente as telas foram secas em papel de filtro e fixadas com glutaraldeído 1,0% em PHEM por 10 minutos. Após fixação foi processada a lavagem das mesmas em 5 gotas de PHEM. As telas foram, então, coradas com acetato de uranila a 1,0% em H<sub>2</sub>O, utilizando-se 3 gotas por 5, 10 e 20 segundos respectivamente, sendo secas em papel de filtro a cada passagem de gota.

Para a desidratação foi utilizado etanol nas concentrações crescentes de 70%, 80%, 90% e 100%, sendo a duração em cada uma das etapas de 5 minutos. Ao término do processo de extração da membrana dos parasitas para que fosse possível a observação do citoesqueleto destes, as telas foram secas ao ponto crítico (CPD) e analisadas em microscopia eletrônica (ME).

## IV - RESULTADOS

### IV.1 - Análise dos extratos protéicos de *C. brasiliensis*.

#### IV.1.1 - Dosagem protéica e de polissacárides

As amostras dos extratos do epicarpo, mesocarpo, endocarpo e semente de *C. brasiliensis*, submetidas a dosagem de proteínas pelo método de LOWRY, demonstrou concentração protéica de, respectivamente, 2074,6; 1894,3; 756,6 e 288,0 µg/ml. Baseado na dosagem de polissacárides, segundo método de ANTRONA, o extrato endocárpico apresentou concentração de 5369,3 µg/ml.

#### IV.1.2 – Perfil protéico SDS-PAGE dos extratos de *C. brasiliensis*

Os resultados do gel de poliacrilamida pela prata estão representados na Figura 2. Diferentes perfis protéicos foram obtidos de acordo com a fração vegetal testada. O extrato do endocarpo de *C. brasiliensis* foi aquele que apresentou um perfil eletroforético mais bem definido, revelando a presença de proteínas de pesos moleculares aparentes de 82, 79, 65, 59, 51, 32, 17, 15, 12 kDa em SDS-PAGE, a 15%.



kDa

97

67

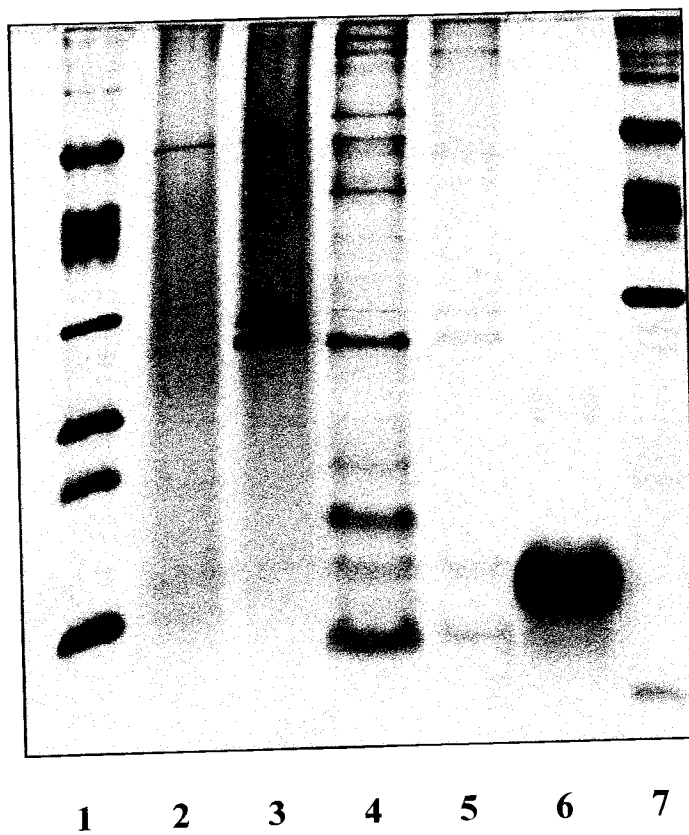
45

29

24

20

14



#### IV.2 – Análise da reação de hemaglutinação dos extratos protéicos de *C. brasiliensis*

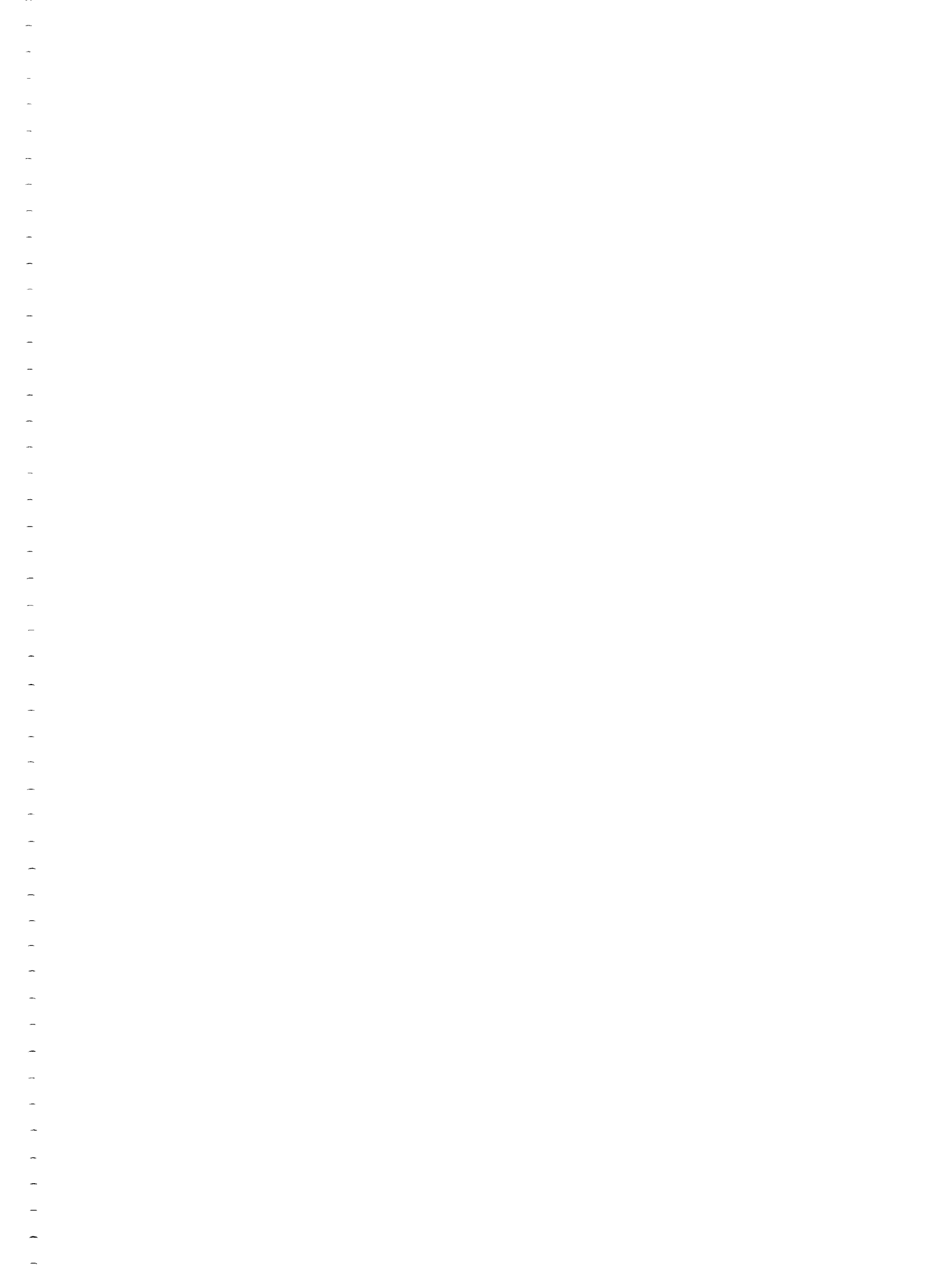
Observou-se que os extratos protéicos de *C. brasiliensis* apresentou diferentes títulos de hemaglutinação frente ao painel de hemácias. Hemácias humanas e de carneiro foram aglutinadas em altos títulos quando se utilizou o extrato endocárpico. Os resultados da reação de hemaglutinação com suspensão de hemácias de camundongo frente aos diferentes extratos de *C. brasiliensis* estão demonstrados na Figura 3. Observou-se marcantes diferenças quanto aos títulos hemaglutinantes, sendo que os maiores foram observados com o extrato endocárpico (640). O extrato da semente foi destituído de atividade hemaglutinante (<5), enquanto que o extrato epicárpico somente apresentou hemaglutinação na primeira diluição (5). O extrato do mesocarpo também apresentou título hemaglutinante baixo (20).

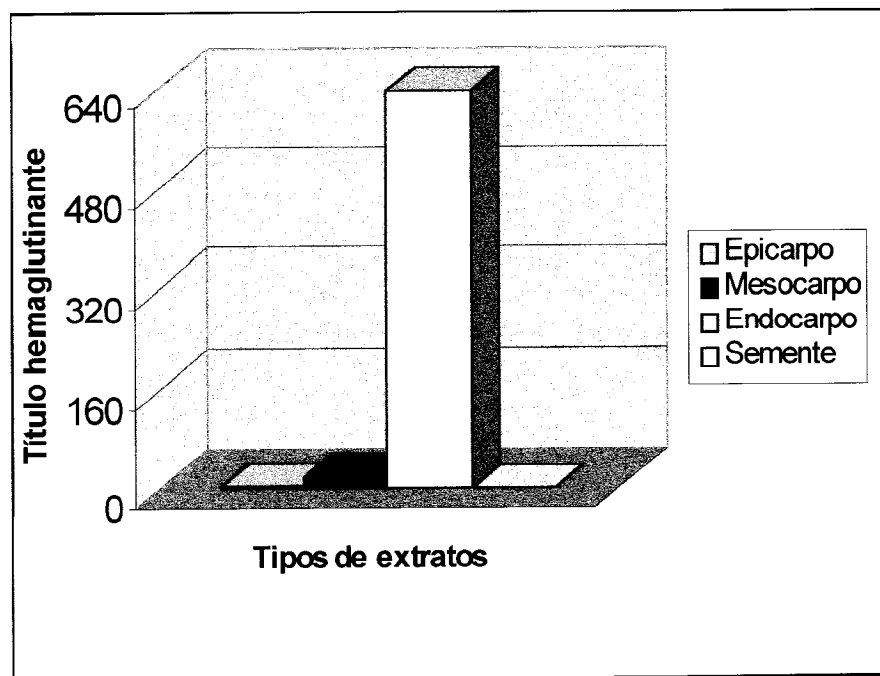
Para o extrato endocárpico de *C. brasiliensis*, foram também realizadas reações de hemaglutinação com diferentes suspensões de hemácias obtidas do sangue de camundongos das linhagem: BALB/c, C57Bl/6, DBA/2, NZW e NZB/W, colhidas em citrato de sódio a 2%. Foi observado que o extrato de *C. brasiliensis* apresentou título superior de 640 quando utilizado eritrócitos de BALB/c, C57Bl/6 e DBA/2, no entanto para os eritrócitos de NZW e NZB/W os títulos apresentaram-se igual a 320 (Tabela 2).



**TABELA 2.** Títulos de hemaglutinação do extrato endocárdico de *C. brasiliensis* com diferentes suspensões de hemácias obtidas do sangue de camundongos das linhagem: BALB/c, C57Bl/6, DBA/2, NZW e NZB/W ajustadas na concentração de 1% em PBS, tendo como anti-coagulante citrato de sódio a 2%.

EXTRATO VEGETAL	ERITRÓCITOS DE LINHAGENS MURINAS				
	BALB/c	C57Bl/6	DBA/2	NZW	NZB/W
Endocarpo de <i>C. brasiliensis</i>	640	640	640	320	320





### IV.3 - Análise da atividade biológica do extrato vegetal sobre macrófagos peritoneais murinos.

A atividade biológica dos extrato de *C. brasiliensis*, foi analisada pela dosagem de óxido nítrico nos sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais obtidos de camundongos das linhagens: BALB/c, C57Bl/6, DBA/2, NZW e NZB/W, ativados com tioglicolato de sódio a 3%, 96 horas antes da realização do experimento. Deste modo, para que fosse realizada esta análise, suspensões de macrófagos acima mencionados foram cultivadas em presença de Con-A (5 µg/ml), LPS (50µg/ml), LPS e IFN-γ (50 µg/ml e 100 U, respectivamente), IFN-γ (100 U) como amostras padrão positivas, ou extrato do endocarpo de *C. brasiliensis* (75,66 µg/ml).

Nos sobrenadantes dos macrófagos de camundongos BALB/c, a indução na produção de NO não foi significativa quando cultivados na presença do endocarpo de *C. brasiliensis*. Além disso, nas células das demais linhagens de camundongos utilizadas, não foi detectado nenhuma produção de óxido nítrico na presença deste estímulo (Tabela 3).

**TABELA 3.** Produção de “NO” por macrófagos peritoneais de camundongos: BALB/c, C57Bl/6, DBA/2, NZW e NZB/W ( $2 \times 10^6$  células por ml de DMEM completo) pré estimulados com tioglicolato de sódio, cultivados na presença de Con-A, LPS, LPS e IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$  ou do extrato do endocarpo de *C. brasiliensis*.

	CONCENTRAÇÕES DE NO ( $\mu\text{M}$ )				
	BALB/c	C57Bl/6	DBA/2	NZW	NZB/W
Meio	1,9	1,6	1,2	1,7	1,6
Endocarpo de <i>C. brasiliensis</i> 75,66 $\mu\text{g/ml}$	2,4	ND	ND	ND	ND
Con-A 5 $\mu\text{g/ml}$	21,5	11,5	9,3	22,3	21,6
LPS 50 $\mu\text{g/ml}$	7,8	7,4	5,5	8,5	5,6
LPS 50 $\mu\text{g/ml}$ + IFN- $\gamma$ 100 U	30,2	17,5	12,9	22,2	20,9
IFN- $\gamma$ 100 U	29,7	22,8	19,8	27,5	32,3

ND- não detectável.

#### IV.4 - Atividade de *C. brasiliensis* sobre hemácias, macrófagos peritoneais murinos e clone E-9

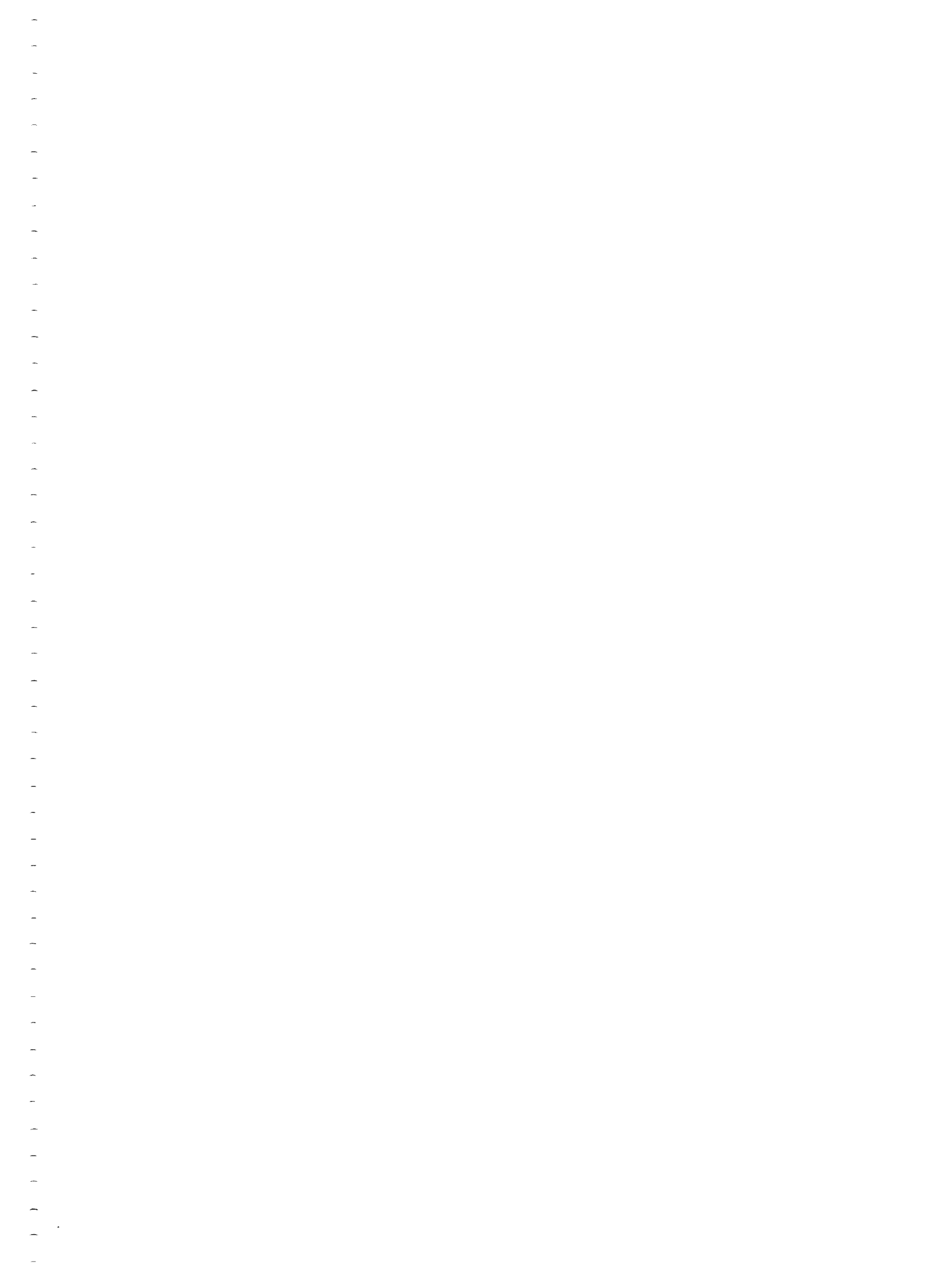
Nas reações para analisar a atividade de *C. brasiliensis* sobre hemácias, macrófagos peritoneais murinos e clone E-9, foi observado que as hemácias tratadas com extrato do endocarpo de *C. brasiliensis*, nas diluições de 1/5 até 1/20, foram 100% lisadas demonstrando atividade lítica. No entanto, a partir da diluição 1/40 e até 1/640 ocorreu aglutinação das hemácias, confirmando a presença da atividade lectínica da amostra endocárpica de *C. brasiliensis*.

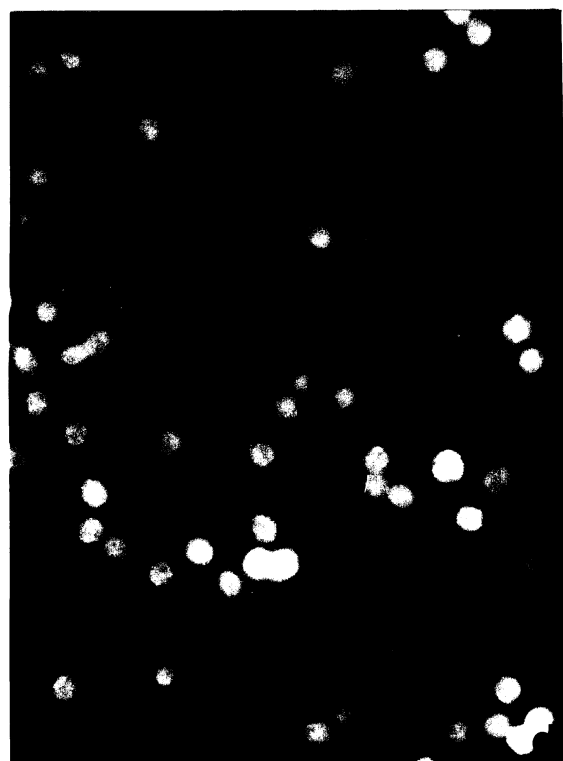
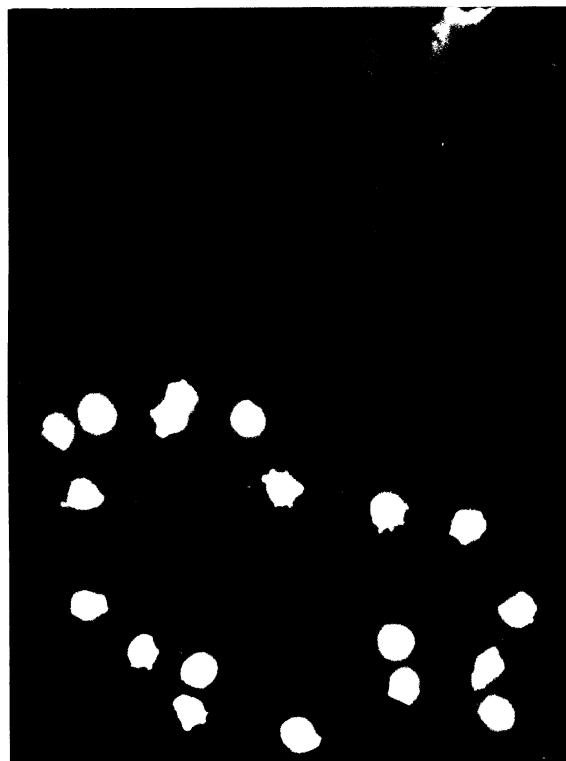
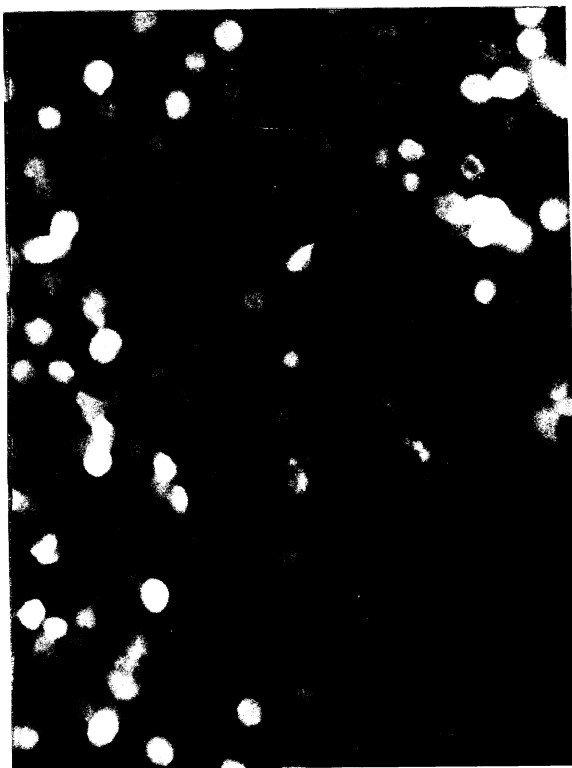
Quando analisados os macrófagos peritoneais murinos e clone E-9 tratados com *C. brasiliensis* a 756,6  $\mu\text{g/ml}$  até 189,2  $\mu\text{g/ml}$ , foi observado 0% de macrófagos e E-

9 viáveis, enquanto que, nas concentrações de 94,6 µg/ml e 47,3 µg/ml, as viabilidades foram de 25 e 60% para macrófagos e 30 e 95% para clone E-9, respectivamente. (Tabela 4 e Pranchas 1 e 2)

**TABELA 4.** Percentagem de viabilidade de macrófagos peritoneais murinos e clone E-9 após duas horas de incubação com extrato endocárpico de *C. brasiliensis* nas concentrações de 756,6 µg/ml até 47,3 µg/ml.

TRATAMENTO DE	VIABILIDADE (%)		
	Mφ e E-9	Mφ peritoneais	E-9
PBS 0,15 M		99	95
<i>C. brasiliensis</i> a 756,6 µg/ml		0	0
<i>C. brasiliensis</i> a 378,3 µg/ml		0	0
<i>C. brasiliensis</i> a 189,2 µg/ml		0	0
<i>C. brasiliensis</i> a 94,6 µg/ml		25	30
<i>C. brasiliensis</i> a 47,3 µg/ml		60	95





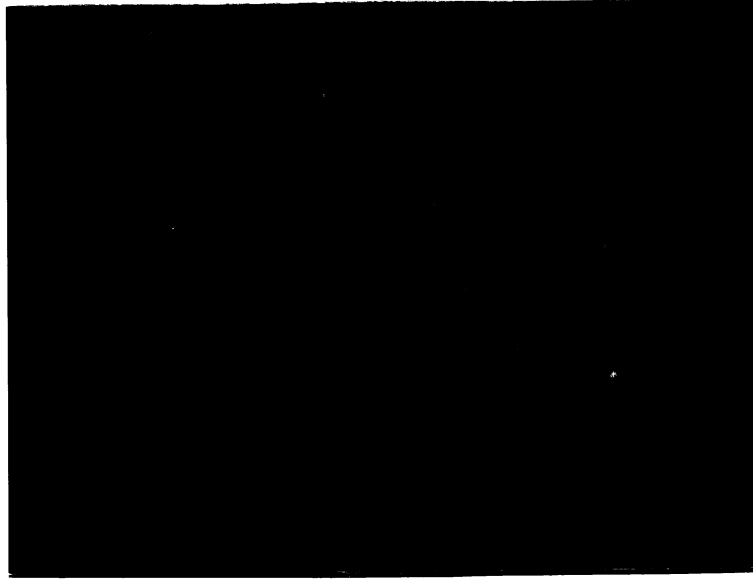


## PRANCHA 2

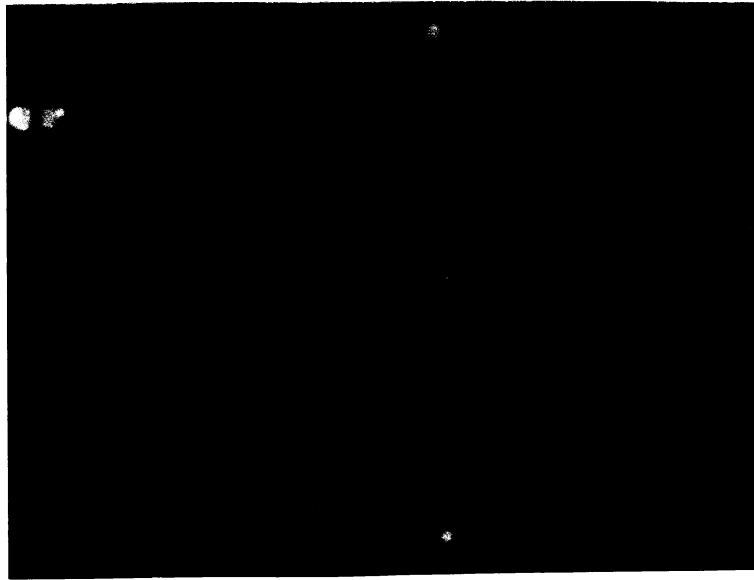
Células do clone E-9, originárias de hibridoma de camundongos BALB/c, tratadas ou não com diferentes concentrações de extrato endocárpico de *C. brasiliensis*, corados com Fluoro-Quench AO/EB (acridina-laranja e brometo de etídio)

**FIGURA A.** Células tratadas com máxima concentração (756,6  $\mu\text{g/ml}$ ) de lectina de *C. brasiliensis*, exibindo alta percentagem de células inviáveis.

**FIGURA B.** Células tratadas com baixa concentração (47,3  $\mu\text{g/ml}$ ) de lectina de *C. brasiliensis*, exibindo alta percentagem de células viáveis.



a



b

**IV.5 - Análise da pré-incubação de *T. gondii* com extrato do endocarpo de *C. brasiliensis*.**

Baseado nas reações de aglutinação realizadas com suspensões de  $10^8$  formas taquizoítas de *T. gondii*, tratadas com o extrato do endocarpo de *C. brasiliensis*, nas concentrações de 756,6 µg/ml, 378,3 µg/ml, 189,15 µg/ml, 94,6 µg/ml e 47,3 µg/ml, corados com Fluoro-Quench AO/EB, foi observado que os parasitas sofreram aglutinação quando tratados com o extrato nas concentrações de 189,2 µg/ml, 94,6 µg/ml e 47,3 µg/ml. Porém, quando foram adicionados as concentrações de 756,6 µg/ml, 378,3 µg/ml e 189,15 µg/ml do extrato vegetal, houve lise de grande parte dos parasitas (Tabela 5).

**TABELA 5.** Determinação da viabilidade de taquizoítas, após tratamento de duas horas com extrato do endocarpo de *C. brasiliensis*.

TRATAMENTOS DE <i>T. gondii</i>	VIABILIDADE DE TAQUIZOÍTAS (%)
PBS 0,15 M	95
<i>C. brasiliensis</i> a 756,6 µg/ml	5
<i>C. brasiliensis</i> a 378,3 µg/ml	10
<i>C. brasiliensis</i> a 189,2 µg/ml	30
<i>C. brasiliensis</i> a 94,6 µg/ml	35
<i>C. brasiliensis</i> a 47,3 µg/ml	70

Diante dos resultados, julgou-se relevante analisar o efeito da lectina de *C. brasiliensis* nos processos de invasão do parasita em células hospedeiras.

#### IV.5.1 - Análise da capacidade de invasão de *T. gondii* tratados com endocarpo de *C. brasiliensis*.

Para analisar a viabilidade de *T. gondii* tratados com extrato do endocarpo de *C. brasiliensis* nas concentrações de 756,6 µg/ml, 378,3 µg/ml, 189,2 µg/ml, 94,5 µg/ml, e 47,3 µg/ml, foram utilizadas hemácias de camundongos BALB/c a 5% em PBS 0,15 M. Ao término da incubação de 30 minutos, as amostras hemácias/*T. gondii*/*C. brasiliensis*, foram coradas com azul Trypan.

As lâminas observadas em microscopia óptica demonstraram que o controle contendo suspensões de hemácias incubadas com *T. gondii*( $10^8$  parasitas) ausente de *C. brasiliensis*, apresentou 80% dos parasitas extracelulares viáveis, com morfologia aparentemente não modificada e 15 a 20% das hemácias parasitadas.

As lâminas contendo hemácias/*T. gondii*/extrato de *C. brasiliensis* a 756,6 µg/ml ou 378,3 µg/ml, demonstraram lise total das hemácias, parasitas com 5 e 10%, respectivamente, de viabilidade, com morfologia aparentemente alterada. Porém, a partir do extrato nas concentrações de 189,2 µg/ml até 47,3 µg/ml, as hemácias se mantiveram íntegras e com presença de parasitas ligados a sua membrana, 50% dos parasitas permaneceram viáveis formando aglomerados e com morfologia normal.

**IV.5.2** - Ensaio de invasão de *T. gondii*, tratados com extrato de endocarpo de *C. brasiliensis*, em macrófagos e enterócitos.

O efeito da atividade do extrato de *C. brasiliensis* no processo de invasão de *T. gondii* em células hospedeiras, foi realizado com enterócitos de rato (IEC), e com macrófagos murinos da linhagem J774 e macrófagos peritoneais ativados com tioglicolato de sódio a 3%.

Como demonstrado na Tabela 6, enterócitos de rato (IEC), macrófagos peritoneais e J774 quando tratados com *C. brasiliensis* nas concentrações de 756,6 µg/ml até 189,2 µg/ml, durante duas horas, demonstraram percentagem de invasão dos parasitas muito baixa, quando não totalmente nula, sendo que os macrófagos da linhagem J774 foram totalmente lisados quando incubados com o extrato vegetal a 756,6 µg/ml.

**TABELA 6.** Determinação da percentagem de *T. gondii* extracelulares (EC), aderidos a membrana (AD) ou internalizados (IC) em macrófagos peritoneais, macrófagos da linhagem J774 e enterócitos de rato (IEC), após tratamento com diferentes concentrações do extrato do endocarpo de *C. brasiliensis*.

TRATAMENTO DE <i>Toxoplasma gondii</i>	CÉLULAS HOSPEDEIRAS		
	IEC	Mφ peritoneais	J774
<u>PBS 0,15 M</u>			
EC	10%	20%	20%
AD	80%	60%	70%
IC	10%	20%	10%
<u><i>C. brasiliensis</i> a 756,6 µg/ml</u>			
EC	80%	35%	100%
AD	20% <sup>1</sup>	60%	0%
IC	0%	5%	0%
<u><i>C. brasiliensis</i> a 378,3 µg/ml</u>			
EC	60%	45%	65%
AD	40% <sup>2</sup>	50%	30%
IC	0%	5%	5%
<u><i>C. brasiliensis</i> a 189,2 µg/ml</u>			
EC	30%	45%	55%
AD	65% <sup>2</sup>	45%	40%
IC	0%	10%	5%
<u><i>C. brasiliensis</i> a 94,6 µg/ml</u>			
EC	20%	35%	30%
AD	75%	50%	60%
IC	5%	15%	10%
<u><i>C. brasiliensis</i> a 47,3 µg/ml</u>			
EC	10%	20%	20%
AD	80%	60%	70%
IC	10%	20%	10%

<sup>1</sup> formação de grandes aglomerados;

<sup>2</sup> formação de pequenos aglomerados.

#### IV.5.3 - Análise do citoesqueleto de *T. gondii* tratados ou não com extrato do endocarpo de *C. brasiliensis*.

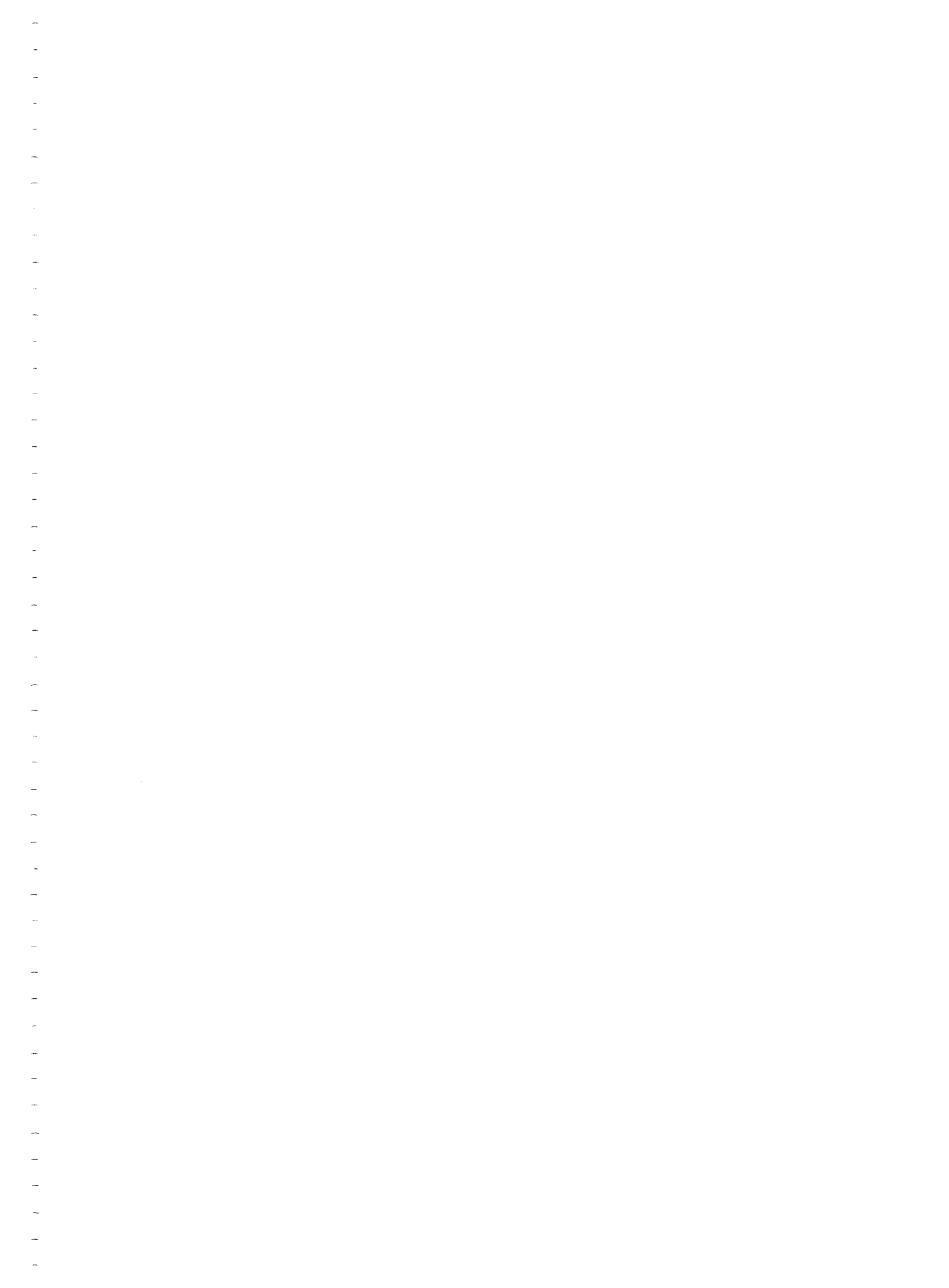
Inicialmente foi realizado um estudo da ultra-estrutura dos *T. gondii* pré-incubados ou não com extrato endocárpico de *C. brasiliensis*, durante duas horas, para analisar possíveis modificações ocorridas no citoesqueleto desses parasitas.

Como observado na Prancha 3, suspensões de *T. gondii* incubadas na ausência do extrato de *C. brasiliensis*, apresentaram extração relativamente eficiente do citoesqueleto, o qual não demonstrou modificações marcantes em sua arquitetura.

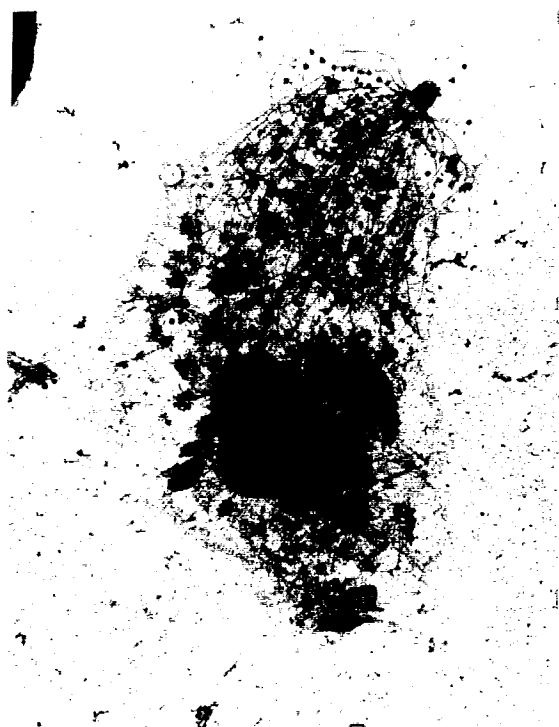
Por outro lado, como observado nas Pranchas de números 4 a 6, suspensões de *T. gondii* incubadas em presença do extrato de *C. brasiliensis*, nas concentrações de 756,6 µg/ml e 378,3 µg/ml, apresentaram modificações importantes em sua morfologia interna e externa. Desestruturação marcante dos elementos do citoesqueleto foi observada, como a não simetria do conjunto de microtúbulos e a extrusão e alteração estrutural do conóide.

#### IV.6 – ELISA para detecção de anticorpos.

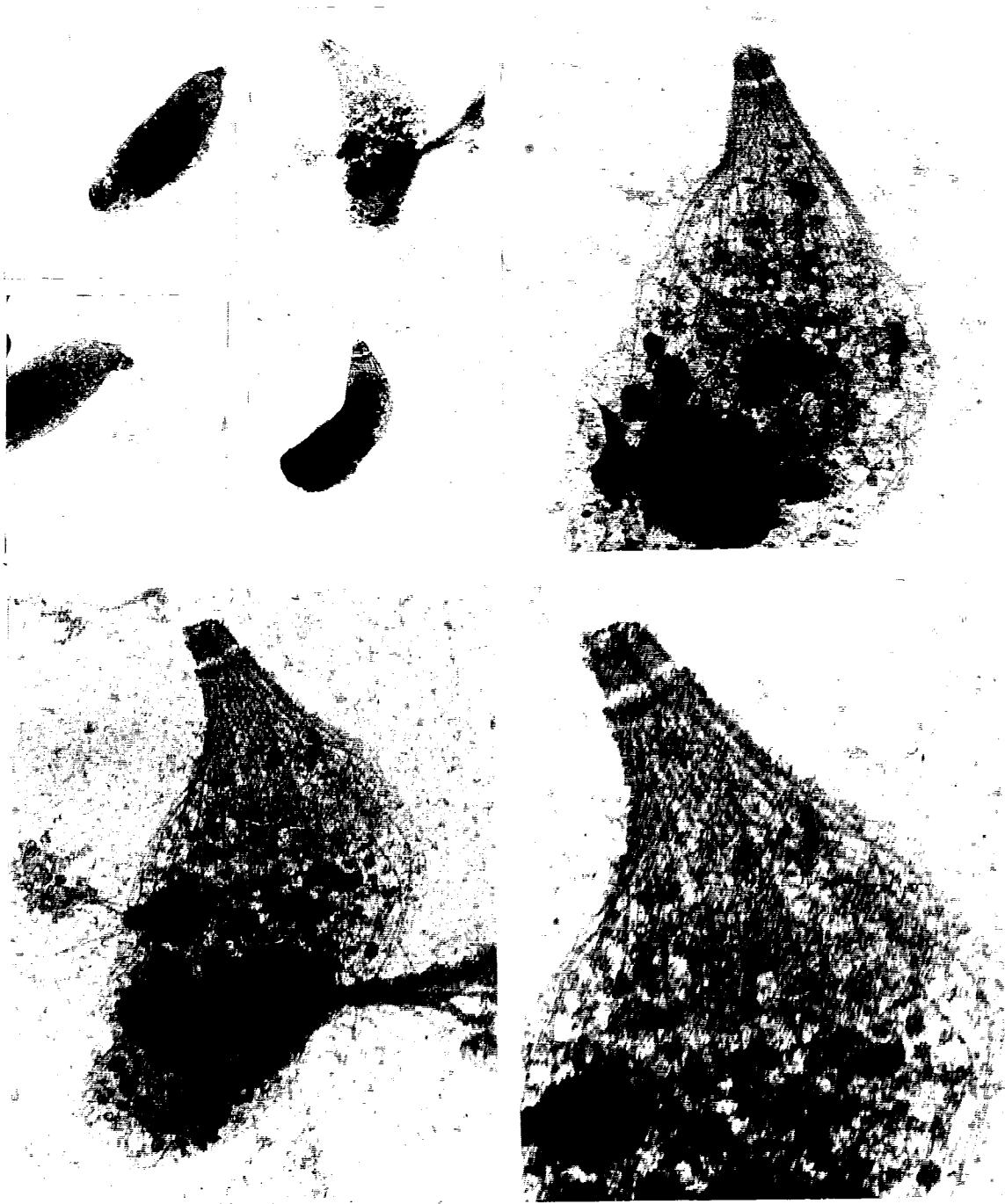
Nos testes de ELISA realizados com amostras de soros dos camundongos sobreviventes, no período de 7 a 21 dias após a infecção, não foi detectado níveis de anticorpos. No entanto, os animais controles, inoculados com suspensões de *T. gondii* na ausência do extrato de *C. brasiliensis* e os animais com *T. gondii* tratados com o extrato vegetal a 94,5 µg/ml, foram a óbito quatro dias após a infecção.

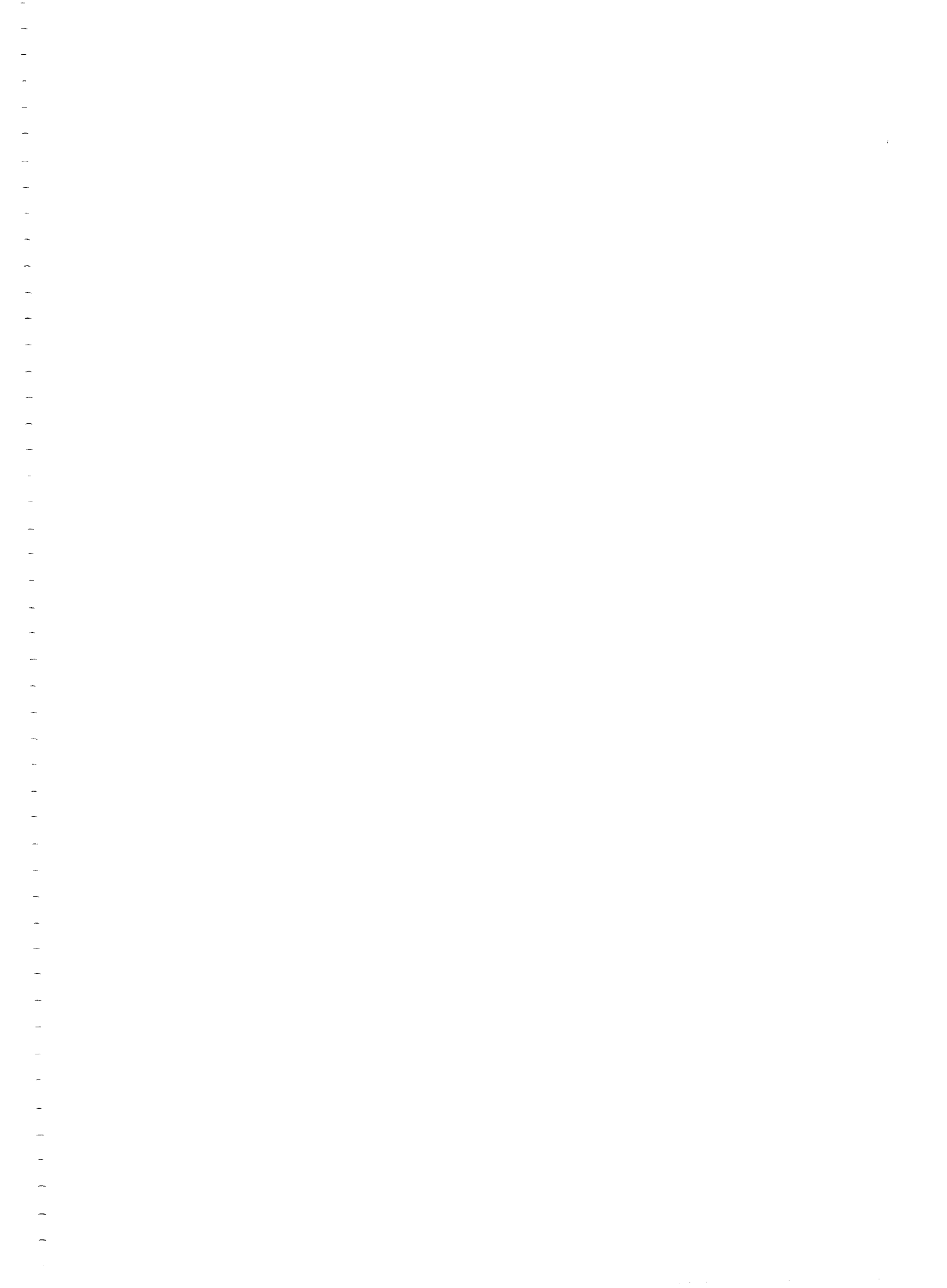


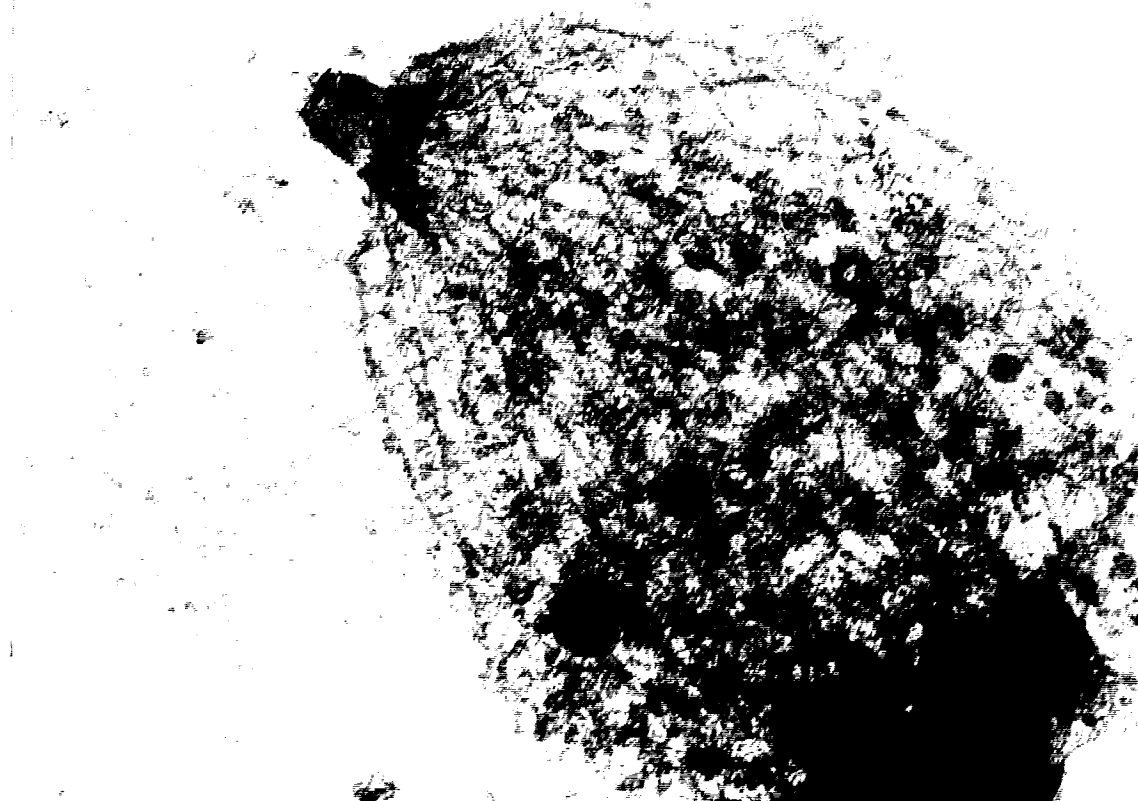




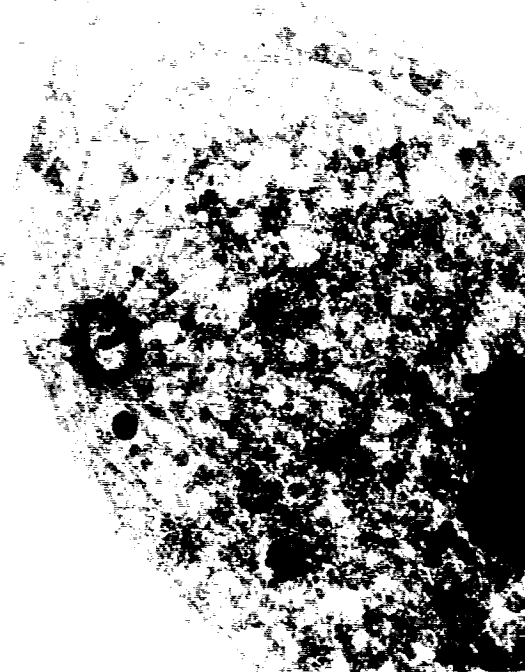








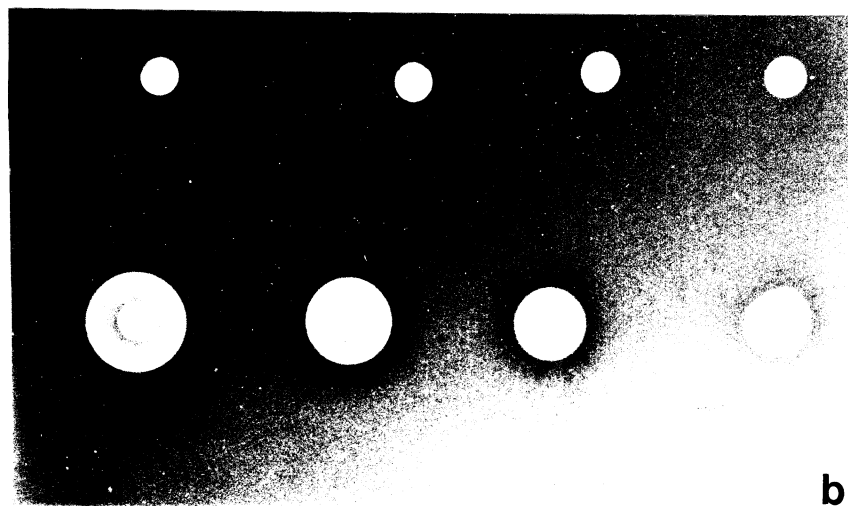
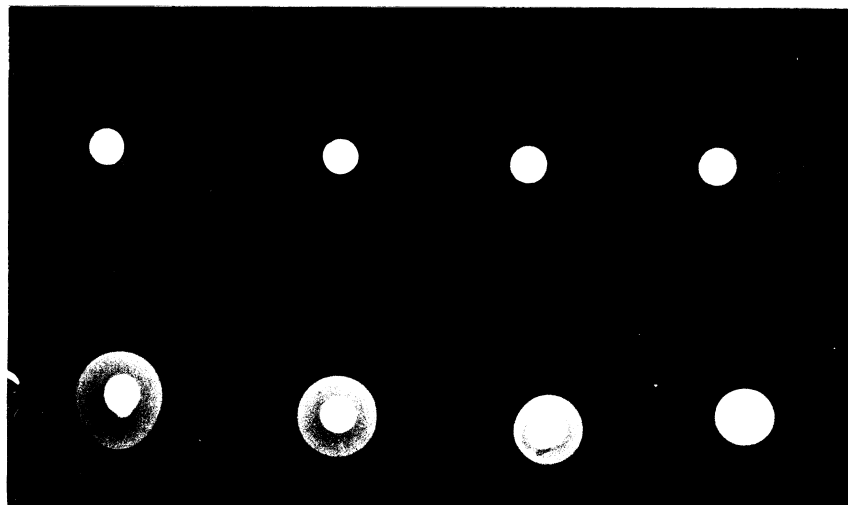




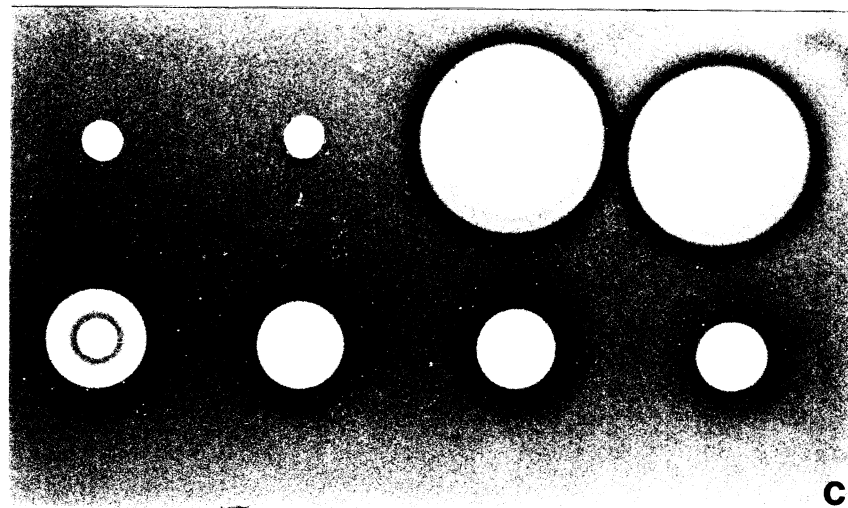
#### IV.7 - Análise da atividade hemolítica indireta de *C. brasiliensis*

Os resultados expressos na Prancha 7, Tabela 7 e Figura 4 demonstram nitidamente a atividade hemolítica do extrato endocárpico de *C. brasiliensis*. As características físico-químicas deste componente hemolítico foram avaliadas quando a preparação foi submetida ao aquecimento ou ao tratamento com EDTA e  $\beta$ -mercaptoetanol. Foi observado que o extrato endocárpico de *C. brasiliensis* adicionado a EDTA não apresentou significativa dependência de cálcio, como a demonstrada pelo veneno de *Bothrops moojeni* que teve sua ação totalmente inativada. No entanto, quando o extrato foi submetido ao aquecimento a 100°C, durante 5 minutos, antes da aplicação na placa, apresentou termolabilidade significativa, embora em menor grau que o demonstrado pelo veneno de *Bothrops moojeni*. Quanto a sensibilidade ao tratamento com  $\beta$ -mercaptoetanol, o extrato endocárpico de *C. brasiliensis* apresentou significativa redução em sua atividade hemolítica, diferentemente do veneno de *Bothrops moojeni* que apresentou redução mínima desta atividade quando tratado com este agente redutor.





b

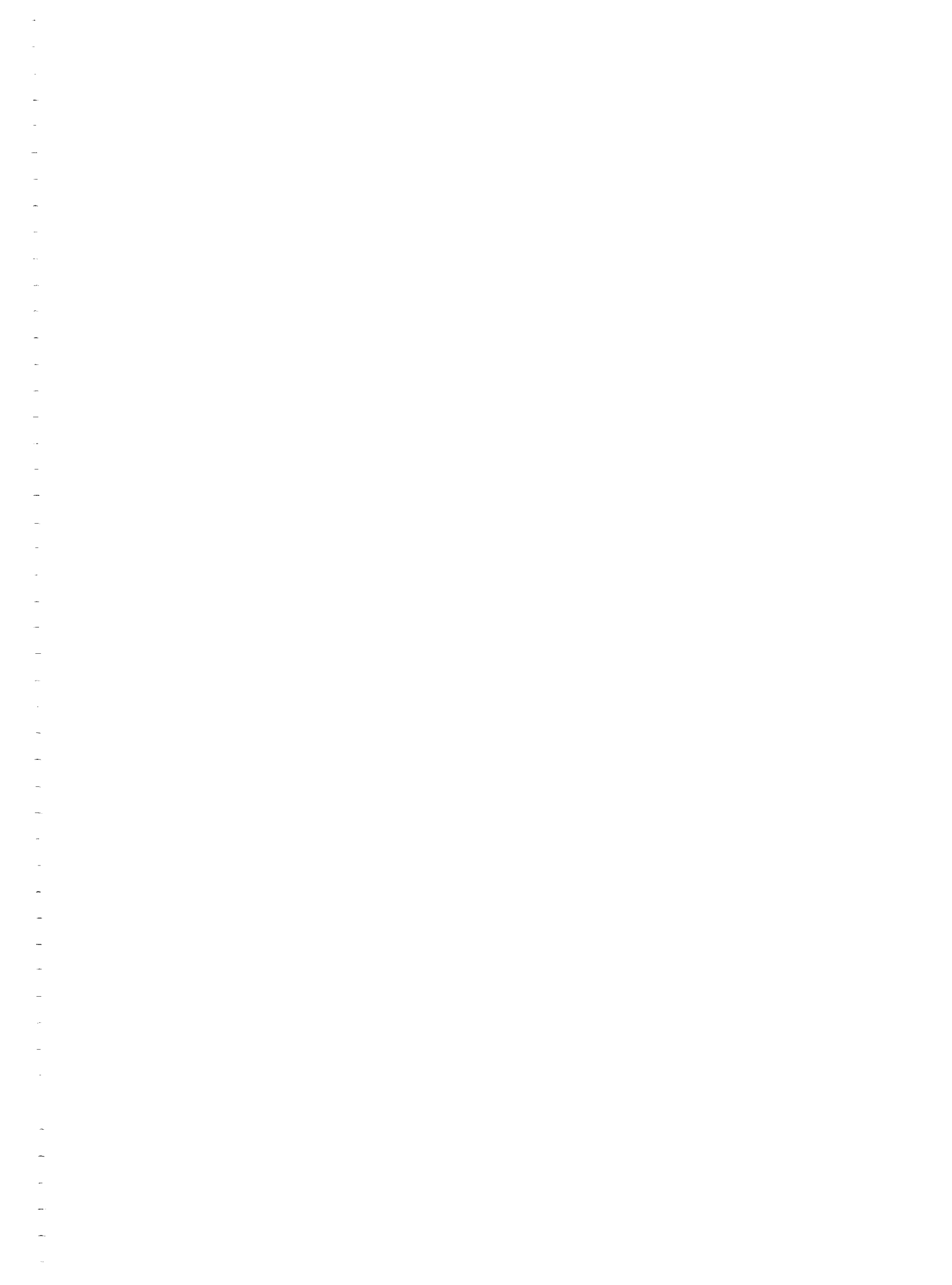


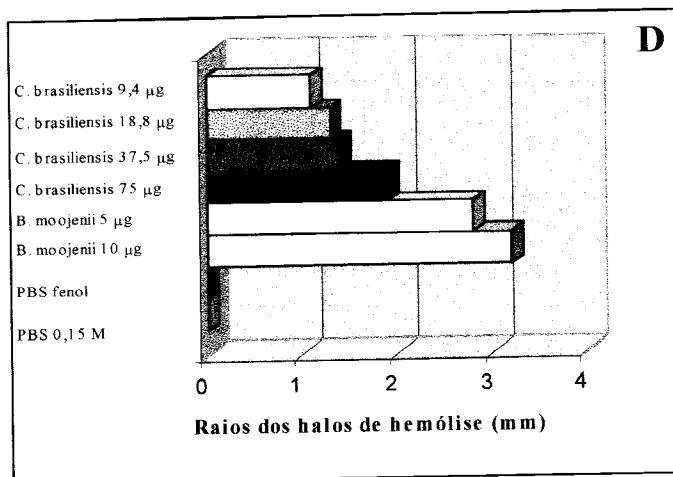
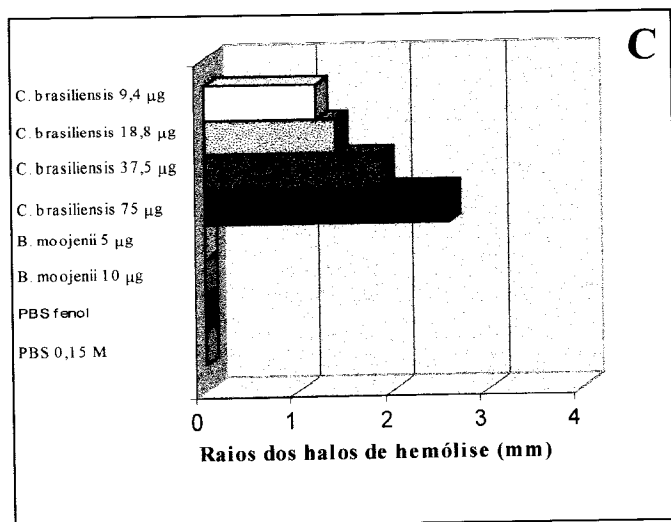
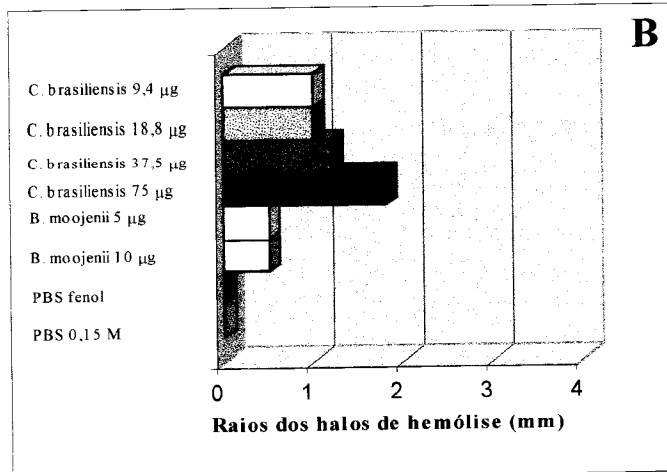
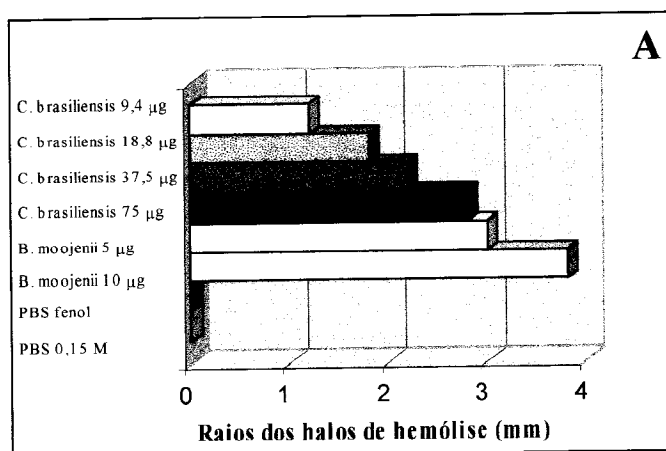
c

**Tabela 7.** Análise da atividade hemolítica indireta nas diferentes concentrações do endocarpo de *C. brasiliensis*, após 3 horas de observação.

AMOSTRAS	HALOS DE HEMÓLISE (raio, em mm)			
	Controle <sup>1</sup>	Aquecida <sup>2</sup>	EDTA <sup>3</sup>	$\beta$ -ME <sup>4</sup>
PBS	0	0	0	0
PBS fênol	0	0	0	0
<i>Bothrops moojeni</i> a 10 $\mu$ g	3,8	0,5	0	3,2
<i>Bothrops moojeni</i> a 5 $\mu$ g	3,0	0,5	0	2,8
<i>C. brasiliensis</i> a 75 $\mu$ g	2,8	1,8	2,6	1,9
<i>C. brasiliensis</i> a 37,5 $\mu$ g	2,2	1,2	1,9	1,4
<i>C. brasiliensis</i> a 18,8 $\mu$ g	1,8	1,0	1,4	1,3
<i>C. brasiliensis</i> a 9,4 $\mu$ g	1,2	1,0	1,2	1,1

<sup>1</sup> e <sup>2</sup>- placas de hemólise contendo hemácia/gema de ovo/amostras a 4°C ou a 100°C respectivamente; <sup>3</sup>-placas de hemólise com hemácias/gema de ovo/EDTA a 50 mM/amostras a 4°C; <sup>4</sup>- placas de hemólise com hemácias/gema de ovo/ $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME) a 0,05%/amostras a 4°C.





#### IV.8 - Análise da atividade enterotóxica do extrato endocárpico *C. brasiliensis*

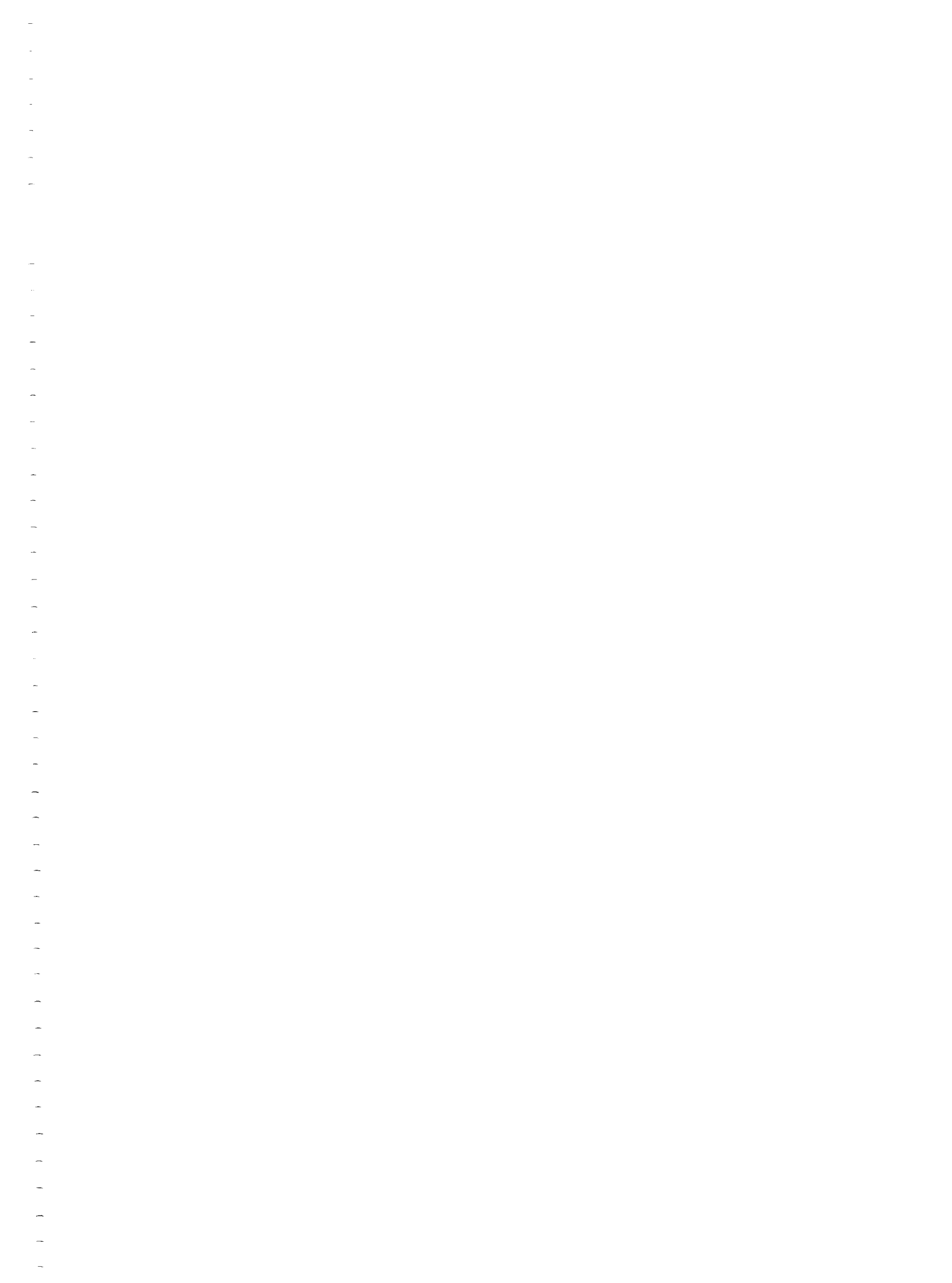
A avaliação da atividade enterotóxica de *C. brasiliensis* em camundongos BALB/c está demonstrada na Tabela 8. A partir da análise dos dados obtidos, concluiu-se que o tratamento *in vivo* desta lectina vegetal foi capaz de induzir efeito enterotóxico, uma vez que o grupo experimental apresentou índices de enterotoxicidade maiores que o grupo controle (diferença dos valores médios igual a 0,02).

**TABELA 8.** Determinação da atividade enterotóxica da lectina extraída do endocarpo de *C. brasiliensis* em camundongos neonatos (3 a 4 dias de idade) BALB/c.

Grupos de Animais	Massa Corporal em gramas (MCO)	Massa Instestinal em gramas (MIN)	Massa Carcaça em gramas (MCA)	Índice de Enterotoxicidade (MIN/MCA)
<b>Controle</b>				
Animal 1	2,15	0,28	1,81	0,155
Animal 2	1,91	0,21	1,63	0,129
Animal 3	1,41	0,14	1,23	0,114
Animal 4	1,54	0,12	1,36	0,090
Média Controle	1,75	0,19	1,51	0,122
<b><i>C. brasiliensis</i></b>				
Animal 1	1,50	0,13	1,30	0,100
Animal 2	2,32	0,30	1,95	0,154
Animal 3	2,34	0,37	1,93	0,192
Animal 4	1,65	0,16	1,45	0,110
Animal 5	1,55	0,20	1,33	0,150
Média <i>C. brasiliensis</i>	1,87	0,23	1,59	0,142

#### IV.9 - Análise da atividade proteolítica do extrato endocárpico de *C. brasiliensis*

Os resultados obtidos na avaliação da atividade proteolítica do extrato endocárpico de *C. brasiliensis* estão demonstrados na Figura 5. Utilizando-se a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), contendo gelatina a 0,5 mg/ml como substrato protéico, foi observada a presença de proteólise marcante na região equivalente a um peso molecular aparente de 80 kDa. Em ambas preparações, realizadas a 15% e a 10% de concentração de poliacrilamida, foi possível verificar proteólise nesta região de alto peso molecular.



kDa

A

97

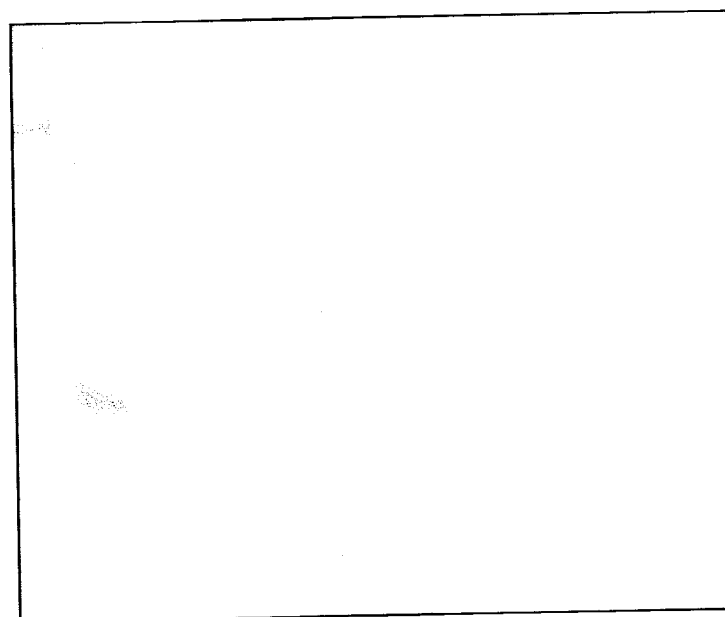
67

45

29

24

20



1

2

3

4

5

6

7

8

kDa

B

97

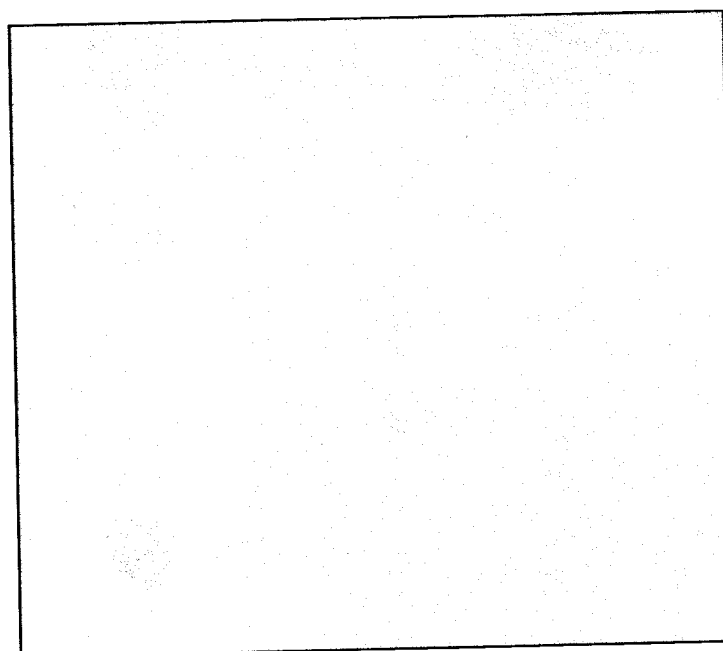
67

45

29

24

20



1

2

3

4

5

6



## V - DISCUSSÃO

As moléculas denominadas lectinas apresentam uma grande abundância na natureza e uma grande diversidade com relação a suas capacidades de ligação com carboidratos. Estas propriedades fizeram com que as lectinas passassem a ser reconhecidas como ferramentas valiosas para a detecção e isolamento de glicoproteínas e caracterização parcial das porções carboidratos dessas glicoproteínas. Assim, torna-se possível o acompanhamento de mudanças que ocorrem nos açúcares da superfície das células em processos como desenvolvimento, bem como os processos de diferenciação e transformação neoplásica (LIS & SHARON, 1986).

A hipótese de que lectinas correspondam a moléculas que desempenhem importante papel em fenômenos diversos de reconhecimento celular foi confirmada e ampliada nos últimos 30 anos, motivando intenso investimento de esforços em pesquisas no campo da lectinologia.

No presente estudo, foram demonstrados os resultados utilizando-se um extrato do endocarpo de *C. brasiliensis*, observando-se uma marcante hemaglutinação ativa quando em contato com eritrócitos de diferentes espécies, mesmo em concentrações inferiores a 1,89 µg.

Baseado em BEUTH *et al.*, 1990, lectinas estão associadas a diferentes atividades biológicas devido sua interação com glicoproteínas presentes nas superfícies celulares. No entanto, a propriedade biológica mais amplamente conhecida das lectinas, é sua capacidade de aglutinar eritrócitos de diferentes espécies animais.

Observações sobre a seletividade das aglutininas vegetais foram descritas por LANDSTEINER & RAUBITSCHHECK (1908), que observaram que atividades hemaglutinantes relativas de vários extratos de semente foram diferentes, quando testadas frente a eritrócitos de diferentes espécies animais. A ricina, que é um exemplo de lectina, descrita por STILLMARK (1889)., extraída da semente de mamona (*Ricinus communis*), apresenta propriedade de aglutinar hemácias em vasos sanguíneos pequenos.

Tem sido descrito na literatura que uma mesma planta pode conter lectinas completamente diferentes, em termos de especificidade de ligação a carboidrato. É o que acontece com a *Vicia cracca* que, além de uma série de isolectinas típicas que ligam N-acetil-glicosamina (RÜDIGER, 1977), contém uma segunda lectina, ligante de glicose/manose (BAUMANN & col., 1979, 1982).

Há relato de proteínas desempenhando juntamente com sua atividade lectínica, alterações nas porções glicolisadas de membranas celulares, levando à lise de células. O resultado final destes efeitos é praticamente irreversível, e tem como finalidades nutrição, manutenção da homeostase, e outras alterações que levam a uma reorganização e modificações na produtividade celular. Esta dualidade de funções lítica-lectínica pode ser encontrada na mesma molécula ou em subunidades ligadas ou distintas, como descrito por GILBOA-GARBER & GARBER (1989). Além disso, a lectina ou lisina podem ser solúveis ou apresentarem-se como componentes celulares localizados intra ou extracelularmente.

No presente trabalho, foi possível demonstrar que o extrato endocárpico de *C. brasiliensis* apresenta esta dualidade de funções, apresentando conjuntamente as atividades lectínica e lítica. Isto ficou demonstrado tanto pela aglutinação do painel de hemácias como pela atividade lítica sobre substratos celulares como o enterócito murino,

macrófagos peritoneais e de linhagens contínuas de cultura, hemácias, clone derivado de hibridoma murino e formas taquizoítas do *T. gondii*.

Várias funções biológicas da lectinas estão bem conhecidas. No entanto, admite-se que suas funções biológicas básicas são consideradas ainda não bem caracterizadas. Evidências experimentais e considerações teóricas suportam a concepção de que uma das funções básicas das lectinas ou das moléculas consideradas “lectina-like” em microrganismos, plantas e animais seria a de atuarem permitindo o desencadeamento de atividades enzimáticas centrais, como glicosidases, proteases, esterases, fosfatases, hemolisina, etc. Dessa maneira, a afinidade destas moléculas por receptores glicosilados, ancorando-se nestes e induzindo-os a modificações conformacionais, levam-nas a desempenharem, por exemplo, atividades líticas sobre células alvos ou moléculas endógenas ou exógenas (GILBOA-GARBER & GARBER, 1989).

No presente trabalho, os resultados das reações utilizadas para analisar a atividade lítica de *C. brasiliensis* sobre macrófagos peritoneais e células do clone E-9, originário de hibridoma murino, demonstraram que, quando adicionado à lectina nas concentrações de 756,6 µg/ml até 189,2 µg/ml, causou lise total dessas células. No entanto, quando utilizada em concentrações menores, a percentagem de viabilidade dessas células variou em torno de 25 a 95%.

Em relação aos experimentos com macrófagos peritoneais murinos, estimulados com tioglicolato de sódio, a lectina de *C. brasiliensis* demonstrou-se incapaz de induzir a produção de NO, por esses macrófagos. Possivelmente esta não detecção de NO, deve-se à presença da atividade lítica nesta lectina, inviabilizando as células a produzir NO. Alternativamente, quando utilizada em doses não líticas este extrato de *C.*

*brasiliensis* poderia levar a indução da produção de citocinas de padrão Th<sub>2</sub>, que normalmente inibe a produção de NO por macrófagos.

Experimentos *in vivo* conduzidos em camundongos neonatos, com inoculação intragástrica de extrato de *C. brasiliensis*, para se avaliar o efeito enterotóxico desta lectina confirmou o dano tecidual em enterócitos por apresentar índices de toxicidade significativos nestes animais.

A toxicidade da lectina extraída de *C. brasiliensis* foi também analisada sobre formas taquizoítas de *T. gondii*, tanto nos parasitas extracelulares, como nos eventos celulares que ocorrem durante os processos de aderência e invasão às células hospedeiras, como enterócitos e macrófagos. Marcante atividade citotóxica foi observada tanto nos parasitas como nas células hospedeiras, quando tratados com concentrações acima de 100 µg/ml. Esta citotoxicidade interferiu nas atividades de aderência dos parasitas às células hospedeiras e, conseqüentemente, na sua internalização. A análise ultraestrutural dos parasitas tratados demonstrou alterações importantes nos elementos do citoesqueleto do parasita, particularmente marcada pelo encontro de uma assimetria dos pares de microtúbulos e extrusão do conóide. A citotoxicidade do extrato de *C. brasiliensis* sobre *T. gondii* foi confirmada em experimentos *in vivo* pela inibição do processo infeccioso em camundongos inoculados com parasitas tratados.

A avaliação da atividade hemolítica de *C. brasiliensis* foi desenvolvida em meio semi-sólido de agarose. Foi verificada uma marcante atividade hemolítica desta lectina vegetal neste substrato utilizado. Com relação a caracterização físico-química, observou-se que, quando as amostras de *C. brasiliensis* foram aquecidas a 100°C, durante cinco minutos, apresentaram uma termoestabilidade significativamente maior que aquela apresentada pela lectina proveniente de *Bothrops moojeni*. Quanto a dependência de cálcio para desempenhar sua atividade biológica, observou-se que, quando adicionado

EDTA ao extrato de *C. brasiliensis*, ocorreram alterações pouco significativas nas formações dos halos de hemólise. Esta alteração foi do tipo dose-dependente, e não ocorreu nas menores concentrações da lectina de *C. brasiliensis*. Esta interferência na atividade hemolítica em presença do EDTA ocorreu em menor intensidade quando comparada aos halos de hemólise da lectina proveniente de *Bothrops moojeni*, que apresentou uma inibição total da atividade hemolítica. Portanto, a lectina de *C. brasiliensis* apresenta uma atividade hemolítica que pode ser definida presentemente como apenas parcialmente dependente de cálcio, quando utilizadas em concentrações acima de 50 µg/ml. Ainda de acordo com os resultados obtidos nesta caracterização físico-química, observou-se nos experimentos de placas hemolíticas que a adição de β-mercaptoetanol ao extrato de *C. brasiliensis* causou redução apenas parcial da sua atividade hemolítica. Esta inibição foi, no entanto, significativamente maior que a obtida pela lectina de *B. moojeni* que apresentou uma inibição em menor grau de intensidade. Desta maneira, pode ser postulado que o(s) sítio(s) molecular(es) presente(s) no extrato de *C. brasiliensis* responsável(is) por esta atividade hemolítica são pontes dissulfeto dependentes, de forma a apresentar queda na atividade hemolítica quando tratados com o agente redutor β-mercaptoetanol.

No presente trabalho, foi identificada uma fração com atividade proteolítica no extrato de *C. brasiliensis*, apresentando um peso molecular aparente em torno de 80 kDa. Não é possível até o presente, afirmar se as atividades lectínica e lítica sejam atividades originárias de uma mesma fração protéica ou de frações distintas. Estudos estão sendo conduzidos no presente com o objetivo de se obter frações cromatograficamente bem definidas, relacionando-as com suas atividades biológicas.

Pelos resultados obtidos, não podemos afirmar se as atividades tóxicas do extrato de *C. brasiliensis* estejam restritas a atividade enzimática sobre proteínas. Os

dados observados nos experimentos utilizando as placas hemolíticas são também indicativos de que possa estar presente outras enzimas atuando sobre outros substratos como por exemplo fosfolípidos. Neste contexto, inúmeros estudos têm sido relatados recentemente demonstrando atividades fosfolipases a partir de lectinas vegetais (STAHL *et al.* 1998; MUNNIK *et al.*, 1998; ). Por outro lado, recentes estudos têm também relatado a associação de atividade hemolítica de certas lectinas sobre vesículas de fosfolípidos, demonstrando que existem monômeros com diferentes domínios que se ligam especificamente a carboidratos e interagem com fosfolípidos. Desta maneira, açúcares específicos podem regular a habilidade da lectina em formar poros sobre bicamadas lipídicas (SAHA & BANERJEE, 1997).

Tem sido observada uma considerável analogia entre as lectinas e os sítios líticos de enzimas, imunoglobulinas e hormônios polipeptídicos. A analogia das lectinas com os sítios enzimáticos ativos e imunoglobulinas pode ser interpretada como importante na lise de macromoléculas importantes na nutrição e na manutenção da homeostase, respectivamente. A analogia das lectinas com os hormônios pode ser entendida como importantes nas alterações celulares lectina-dependentes, e estas incluem modificações nas propriedades de proteínas estruturais. Estes dados nos remetem para as funções lectinas de apresentar afinidade por moléculas ou células glicosiladas , promovendo interações célula-substrato a célula-célula que são importantes em mecanismos de fusão, invasão, transformação celulares e formação de estruturas especiais. Todas estas funções concorrem para o desenvolvimento de atividades essenciais, mesmo em microambientes em condições físico-químicas desfavoráveis. Dessa maneira, a resistência das lectinas a proteólise, a mudanças significativas de pH e temperatura, ou na ausência de certos micronutrientes, são importantes para a manutenção de suas atividades biológicas (GILBOA-GARBER & GARBER, 1989).

O presente trabalho teve como objetivo analisar as atividades lectínicas, tóxicas e hemolíticas do extrato endocárpico de *Caryocar brasiliensis*. Nenhum relato está citado na literatura enfocando estes aspectos de estudo nesta espécie. O único trabalho que analisou uma espécie do mesmo gênero, *Caryocar glabrum*, identificou um fragmento com atividade enzimática descrita como ribulose-1,5-bifosfato carboxilase (FAY *et al.*, 1997).

Considerando as características do extrato endocárpico de *Caryocar brasiliensis* até agora observadas no presente trabalho, podemos inferir que esta lectina apresenta potencial promissor como ferramenta de estudo em modelos de biologia celular, particularmente nos modelos de interação parasita-célula hospedeira.

## VI – CONCLUSÕES

1. Extratos protéicos de *Caryocar brasiliensis* apresentam atividade hemaglutinante frente a um painel de hemácias, sendo que os maiores títulos hemaglutinantes foram observados quando se utilizou o extrato endocárpico.
2. A lectina do endocarpo de *C. brasiliensis* apresenta proteínas de diferentes pesos moleculares aparentes, variando de 12 a 82 kDa.
3. A lectina de *C. brasiliensis* quando utilizada *in vitro* não induziu a produção de metabólitos de nitrogênio (NO) em macrófagos peritoneais de camundongos isogênicos de diferentes linhagens.
4. A lectina de *C. brasiliensis* apresenta atividade tóxica para células de mamífero, como macrófagos peritoneais e de linhagem contínua,(J774) clone E-9 de hibridoma murino e enterócito murino (IEC).
5. A lectina de *C. brasiliensis* é lítica para formas taquizoítas de *T. gondii*, alterando sua morfologia ao nível estrutural e ultra-estrutural, interferindo nos processos de adesão e invasão deste protozoário à célula hospedeira.
6. Esta lectina apresenta uma marcante atividade hemolítica, sendo que o componente responsável por esta atividade biológica é parcialmente



sensível ao aquecimento e tratamento com  $\beta$ -mercaptoetanol, e muito pouco sensível a agente quelante de cálcio.

7. Esta lectina apresenta atividade enterotóxica em experimentos *in vivo* utilizando-se camundongos BALB/c neonatos.
8. A lectina de *C. brasiliensis* apresenta um componente molecular de peso aparente de 80 kDa com atividade proteásica.
9. Novos estudos são necessários para correlacionar as atividades biológicas do extrato do endocarpo de *C. brasiliensis* com os seus diferentes componentes moleculares.

## VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMATO-NETO, V., MEDEIROS, E. A. S. de., LEVI, G. C., DUARTE, M. I. S.,  
**Toxoplasmose**. Ed. Sarvier, SP, 1995. p. 6-13, 69-72
- APPUKUTTAN, P.S. & BASU, D. Four identical subunits in jack fruit seed agglutinin offer only two saccharide binding sites. **FEBS**. **180**: 331-334. 1985.
- BUCKLEY, S. M. Survival of *Toxoplasma gondii* in mosquito cell lines and establishment of continuous infection in Vero cell cultures, **Exper. Parasitol.** V. 33, p. 23-26, 1973
- BUNN-MORENO, M.M. & CAMPOS-NETO, A. A lectin(s) extracted from seeds of *Artocarpus integrifolia* (jack fruit): potent and selective stimulator(s) of distinct human T and B cell functions. **J. Immunol.** **127**: 427-429. 1981.
- CHILSON, O.P., BOYLSTON, A.W. & CRUMPTON, M.J. *Phaseolus vulgaris* phytohaemagglutinin (PHA) binds to the human T lymphocyte antigen receptor. **EMBO J.** **3**: 3229-3245. 1984.
- CLEVERS, H., ALRCON, B., WILEMAN, T. & TERHORST, C. The cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. **Rev. Immunol.** **6**: 629-662. 1988.
- CRANE, I., LEUNG H., BARWICK, S., PARTI, S. & MEAGER, A. The preparation of interferon gamma-producing T-cell hybridomas from jacalin-stimulated T lymphocytes and the SH9 T-cell line. **Immunol.** v. 53, p. 855-859, 1984.
- CUMMINGS, R.D. Lectins as tools for glycoconjugate purification and characterization. *In: Glycosciences, Status and Perspectives*. Eds. By GABIUS, H.J. & GABIUS, S. Chapman & Hall GmbH, Weinheim, Germany. pp. 191-199. 1997.

- ENDO, Y., MITSUI, K., MOTIZUKI, M., TSURUGI, K. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. **J. Biol. Chem.** v. 265, n. 12, p. 5908-5912, 1987.
- FAY, M. F., SWENSEN, S. M. & CHASE, M. W. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, large subunit (fragment). Submitted (Jan-1997) to EMBL/GENBANK/DDBJ DATA BANKS. Sequence from N. A. 1997.
- FURTADO, G. C., CAO, Y. & JOINER, K.A. Laminin on *Toxoplasma gondii* mediates parasite binding to the  $\beta 1$  ativação policlonal de linfócitos integrin receptor  $\alpha 61$  on human foreskin fibroblasts and chinese hamster ovary cells, **Infect. and Immun.** v. 60, p. 4925-4931, 1992
- GALELLI, A. & TRUFFA-BACHI, P. Urtica dioica Agglutinin - A superantigenic lectin from stinging nettle rhizome. **J. Immunol.** v. 151, n. 4, p. 1821-1831, 1993.
- GILBOA-GARBER, N. & GARBER, N. Microbial lectin cofunction with lytic activities as a model for a general basic lectin role. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 5, p. 211-221, 1989.
- GRIMWOOD, J. & SMITH, J. E. *Toxoplasma gondii*: the role of parasite surface and secreted proteins in host cell invasio. **Int. J. Parasitol.** v. 26, n. 2, p. 169-173, 1996.
- HAJELA, K. Were lectins primitive Fc receptors? **Immunol. Lett.** 27: 183-190. 1991.
- HERNANDEZ, A.G., RODRIGUES, N., STOJANOVIC, D. The localization of a lectin-like component on the *Leishmania* cell surface. **Mol. Biol. Rep.** 11: 149-153. 1986.
- KASPER, L. H. & MINEO, J. R. Attachment and invasion of host cells by *Toxoplasma gondii*, **Parasitol. Today** v. 10, n. 5, p. 184-188, 1994
- KERY, V. Lectin-carbohydrate interactions in immunoregulation. **Int. J. Biochem.** v. 23, n. 7/8, p. 631-640, 1991.

- KROLICK, K. A., UHR, J., and VITETTA, E. S. Selective killing of leukemia cells by antibody-toxin conjugates: implication for autologous bone marrow transplantation. *Nature*, v. 295, n. 18, p. 604-605, 1982.
- LICASTRO, F., DAVIS, L.J. & MORINI, M.C. Lectins and superantigens: membrane interactions of these compounds with T lymphocytes affect immune responses. *Int. J. Biochem.* **25**: 845-852. 1993.
- LIS, H. & SHARON, N. Lectins as molecules and as tools. *Ann. Ver. Biochem.* **55**: 35-67. 1989.
- LIU, F-T., HSU, D.K., ZUBERI, R.I., KUWABARA, I., CHI, E.Y. & HENDERSEN, Jr. W.R. Expression and function of galectin-3, a  $\beta$ -galactoside-binding lectin, in human monocyte and macrophages. *Am. J. Pathol.* **147**: 1016-1028. 1995.
- MALDONADO, G., PORRAS, F., FERNANDEZ, L. et al. Effect of lectins on mouse peritoneal macrophage phagocytic activity. *Immunol. Invest.* v. 23, n. 6-7, p. 429-436, 1994.
- McCOY, J.J.; MANN, B.J. & PETRI, W.Jr. Adherence and cytotoxicity of *Entamoeba histolytica* or how lectins let parasites stick around. *Infec. Immun.* **62**: 3045-3050. 1994.
- MILLER, H.C., CHANEY, W.G., KLINMAN, N.R. & ESSELMAN, W.J. Regulation of B cell tolerance by murine gangliosides. *J. Cell. Immunol.* **143**: 2933-2938. 1982.
- MINELLI, L.M.S. Identificação, Isolamento e Caracterização Parcial de uma Lectina de *Toxoplasma gondii*, Ligante de D-Galactose. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia aplicadas. Universidade Federal de Uberlândia. 107p. 1995.

- MING, M., CHUENKOVA, M., ORTEGA-BARRIA Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by sialic acid on the host cell and trans-sialidase on the trypanosome. **Mol. Biochem. Parasitol.** **59**: 242-252 1993.
- MOOLTEN, F., ZAJDEL, S. & COOPERBAND, S. Immunotherapy of experimental animal tumors with antitumor antibodies conjugated to Diphtheria Toxin or ricin. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 277, p. 690-699, 1976.
- MOREIRA, R.A. & AINOUIZ, I.L. Lectins from seeds of jack fruit (*Artocarpus integrifolia*): isolation and purification of two isolectins from the albumin fraction. **Biol. Plantarum** **23**: 186-192. 1981.
- MUNNIK, T., IRVINE, R. F. & MUSGRAVE, A. Phospholipid signalling in plants. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1389, p. 222-272. 1998.
- NOWELL, P.C. Phytohaemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. **Cancer Resear.** **20**: 462-466. 1960.
- PEACOCK, J.S., COLSKY, A.S. & PINTO, V.B. Lectins and antibodies as tools for studying cellular interactions. **J. Immunol. Meth.** **126**: 147-157. 1990.
- PEREIRA, M.E. Lectins and agglutinins in protozoa. *In*: **Microbial Lectins and Agglutinins: Properties and Biological Activity**. Ed. MITCHELL, R. John Wiley. New York. pp 297-300. 1986.
- PERKINS, M.E. & ROCCO, L.J. Sialic acid-dependent binding of *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen, Pf200, to human erythrocytes. **J. Immunol.** **141**: 3190-3196. 1988.
- PETRI, W.A. & RADVIN, J.I. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with the galactose-specific adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. **Infect. Immun.** **59**: 97-101. 1991.

- PETRI, W.Jr. & MANN, B.J. Molecular mechanisms of invasion by *Entamoeba histolytica*. **Semin. Cell Biol.** 4: 305-313. 1993.
- PETRI, W.Jr., SMITH, R.D., SCHLESINGER, P.H. Isolation of galactose-binding lectin that mediates the in vivo adherence of *Entamoeba histolytica*.. **J. Clin. Invest.** 80: 1238-1244. 1987.
- PICKLO, M. J., WILEY, R.G., LAPPI, D. A., ROBERTSON, D. Noradrenergic lesioning with an anti-dopamine b-hydroxylase immunotoxin. **Brain Research**, v. 666, p. 195-200, 1994.
- \_\_\_\_\_. Anti-dopamine b-hydroxylase immunotoxin-induced sympathectomy in adult rats. **J. Pharmacol. Exp. Therap.** v. 275, n. 2, p. 1003-1010, 1995.
- RADVİN, J.I. & GUERRANT, R.L. Role of adherence in cytopathic mechanism of Study with mammalian tissue culture cells and human erythrocytes. **J. Clin. Invest.** 68: 1305-1313. 1981.
- RADVİN, J.I., STANLEY, P., MURPHY, C.F. & PETRI, Jr. W.A . Characterization of cell surface carbohydrate receptors for *Entamoeba histolytica* adherence lectin. **Infect. Immun.** 57: 2179-2186. 1989.
- RAVDIN, J.I., CROFT, B.Y. & GUERRANT, R.L. Cytopathogenic mechanism of *Entamoeba histolytica*. **J. Exp. Med.** 152: 377-390. 1980.
- ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. **Imunologia**. 2.ed. São Paulo: Manole, 1992. p.2.9.
- ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. **Imunologia**. 3.ed. São Paulo: Manole, 1993. p. 13.1-13.8.
- ROQUE-BARREIRA, M.C. & CAMPOS-NETO, A. Jacalin: an IgA-binding lectin. **The J. Immunol.** v.134, p. 1740-1743. 1985.
- SABIN, A. B Toxoplasmic encephalitis in children, **JAMA**. v. 116, p. 801-807, 1941.

- SAHA, N. & BANERJEE K. K. Carbohydrate-mediated regulation of interaction of *Vibrio cholerae* hemolysin with erythrocyte and phospholipid vesicle. *J. Biol. Chem.* v. 272, p. 162-167. 1997.
- SCHENKMAN, R.P., VANDERKERCKHOVE, F. & SCHENKMAN, S. Mammalian cell sialic acid enhances invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Infect. Immun.* **61**: 898-902. 1993.
- SCHOTELIUS, J & GABIUS, H.J. Detection and quantification of cell-surface sugar receptors(s) of *Leishmania donovani* by application of neoglycoenzymes. *Parasitol. Res.* v. 78, p. 529-533. 1992.
- SCHOTELIUS, J. Neoglycoproteins as tools for the detection of carbohydrate-specific receptors on the cell surface of *Leishmania*. *Parasitol. Res.* v 78, p. 309-315. 1992.
- STAHL U., EK, B. & STYMNE, S. Purification and characterization of a low-molecular-weight phospholipase A2 from developing seeds of elm. *Plant Physiol.* v. 117, p.197-205. 1998.
- SURESHKUMAR, G.; APPUKUTTAN, P.S. & BASU, D. a-D-galactose-specific lectin from jack fruit (*Artocarpus integrifolia*) seed. *J. Biosci.* **4**: 257-261. 1982.
- SVOBODOVA, M., BATES, P.A. & VOLFF, P. Detection of lectin activity in *Leishmania* promastigotes and amastigotes. *Acta Trop.* **68**: 23-35. 1997.
- TEIXEIRA , A. R. L. & SANTANA, J. M. Immunotoxin inhibition of *Trypanosoma cruzi* release from infected host cells *in vitro*. *Lab. Invest.* vol. 63, n. 2, p. 248-252, 1990.
- THORPE, P. E., ROSS, J. C. W., CUMBER, A. J. et al. Toxicity of diphtheria toxin for lymphoblastoid cells is increased by conjugation to antilymphocytic globulin. *Nature*, v. 271, n. 5647, p. 752-754, 1978.

- THORPE, P. E., WALLACE, P. M., KNOWLES, P. P. et al. Improved antitumor effects of immunotoxins prepared with deglycosylated ricin A-chain and hindered disulfide linkages. **Cancer Research**, v. 48, n. 22, p. 6257-6623, 1988.
- WARD, H.D. Glycobiology of Parasites: Role of Carbohydrate-Binding Proteins and Their Ligands in the Host-Parasite Interaction. *In: Glycosciences, Status and Perspectives*. Eds. GABIUS, H.J & GABIUS, S. Chapman & Hall GmbH, Weinheim, Germany. pp. 399-413. 1997.
- WERCK, R. How does *Toxoplasma gondii* enter host cells? **Rev. Infect. Dis.** V. 7 n. 4, p. 449-457, 1985
- WERCK, R. Biology of *Toxoplasma gondii* host cell entry: the role of recognition and attachment for invasion of host cells. **In: Intracellular Parasitism** Ed. James W. Moulder, CRC Press, Inc. Boca Raton, Fl, 1989
- WHISLER, R.L. & YATES, A.J. Regulation of lymphocyte responses by human gangliosides. I - Characteristics of inhibitory effects and the induction of impaired activation. **J. Immunol.** **125**: 2106-2111. 1980.
- YOOULE, R. J. & NEVILLE, D. M. Anti-Thy 1.2 monoclonal antibody linked to ricin is a potent cell-type-specific toxin. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 77, n. 9, p. 5483-5486, 1980.



## Sumário

O presente estudo teve como objetivo isolar e caracterizar as proteínas do extrato do fruto de *Caryocar brasiliensis*. Analisou-se a presença de propriedade aglutinante dos extratos protéicos deste vegetal, por meio de técnica de hemaglutinação ativa, para se verificar uma possível atividade lectínica. Em adição, avaliou-se a presença de efeitos tóxicos em células de mamíferos e do protozoário *T. gondii*.

Atividade lectínica foi observada nos extratos do fruto de *C. brasiliensis*, os sendo que os maiores títulos hemaglutinantes foram observados quando se utilizou o extrato endocárpico, o qual apresentou proteínas de diferentes pesos moleculares aparentes, variando de 12 a 82 kDa. Esta lectina apresenta atividade tóxica para células de mamíferos, como macrófagos peritoneais e de linhagem contínua, (J774) clone E-9 de hibroma murino e enterócito murino (IEC0 e para formas taquizóitas de *T. gondii*, alterando sua morfologia ao nível estrutural e ultra-estrutural e interferindo nos processos de adesão e invasão deste protozoário à célula hospedeira. Esta lectina apresentou atividade enterotóxica em experimentos *in vivo* utilizando-se camundongos BALB/c neonatos.

Esta lectina apresentou uma marcante atividade hemolítica, sendo que o componente responsável por esta atividade biológica é parcialmente sensível ao aquecimento e tratamento com  $\beta$ -mercaptoetanol, e muito pouco sensível a agente quelante de cálcio. Foi observado que a lectina de *C. brasiliensis* apresentou um componente molecular de peso aparente de 80 kDa com atividade proteásica.

