

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
Carolina Schwartz

**A lectina vegetal KM+ induz ativação de
Neutrófilos humanos, com conseqüente
aumento da capacidade fagocítica e
microbicida.**

CURITIBA
2007

Carolina Schwartz

A lectina vegetal KM+ induz ativação de Neutrófilos humanos, com conseqüente aumento da capacidade fagocítica e microbicida.

Dissertação apresentada ao Curso de Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Dra. Andréa Novais Moreno

CURITIBA

2007

S399L
2007 Schwartz, Carolina
A lectina vegetal KM+ induz ativação de Neutrófilos humanos, com
conseqüente aumento da capacidade fagocítica e microbicida / Carolina
Schwartz ; orientadora, Andréa Novais Moreno – 2007.
85 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,
Curitiba, 2007
Bibliografia: f. 63-85

1. Imunologia. 2. Lectinas. 3. Fagocitose. 4. Sistema imunológico.
5. Neutrófilos. I. Moreno, Andréa Novais. II. Pontifícia Universidade Católica
do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 20. ed. – 574.29

“Tudo é constante transformação e tudo deveria caminhar para o aperfeiçoamento”.

(L. Boff)

Ao meu Deus ...

... “A pessoa não foi criada para conhecer um fim na morte.
Da morte pode surgir vida: da flor que morre e seca nasce a semente;
da morte da semente nasce a árvore;
do fim do egoísmo nasce o amor;
da morte de Jesus nasce a ressurreição e a vida eterna”.

(L. Boff)

A minha família ...

“Há pessoas que transformam o sol numa simples mancha amarela, mas há **aquelas** que fazem de uma mancha amarela o próprio sol”. (Pablo Picasso)

Ao meu amor ...

“ Fundamental é mesmo o amor,
é impossível ser feliz sozinho”.

(Tom Jobim)

AGRADECIMENTOS

- Ao Deus que me presenteou com a vida, e nela colocou tudo o que preciso para ser feliz - *sua presença é tão certa em minha vida, quanto o ar que eu respiro, quanto o amanhã que se levanta.*
- Aos meus pais, que são fonte de amor incondicional e inspiração, meu porto seguro e meu orgulho.
- Às minhas irmãs, por todo o amor, apoio, amizade, cumplicidade entre todas as coisas maravilhosas que sempre compartilhamos - talvez vocês não tenham idéia da importância que vocês têm em minha vida!
- Ao meu Amor, a pessoa mais inteligente e dinâmica que eu conheço! Por realmente tudo... carinho, atenção, compreensão, força, incentivo.... e todo o restante que não cabem em palavras.
- As minhas amigas e companheiras de mestrado, especialmente a Lu Tomazelli por tantos experimentos e momentos - bons e ruins; mas sempre com compreensão e amizade.
- A minha orientadora Andréa Moreno, que tanto eu perturbei! Meu sincero agradecimento, por tudo!
- Aos professores e orientadores, que implantaram o NIMA e nos ofereceram novas e melhores condições de trabalho.
- Aos colaboradores externos que ofereceram materiais, equipamentos e sua dedicação – especialmente ao Dr. Sandro Bonatto e o Professor Luiz Cláudio Fernandes do laboratório de Fisiologia da UFPR.
- A Dra. Maria Cristina Roque Barreira da USP de Ribeirão Preto – ninguém pode ser mais presente, mesmo ausente, que esta grande pesquisadora! E todos do seu laboratório de Glicoimunologia.

- A CAPES pelo apoio financeiro para a execução desse projeto.
- Aos profissionais do Setor de Ciências Biológicas da PUCPR pela atenção e auxílio constantes.
- Aos professores Dra. Lia Nakao e Dr. Carlos Aita que tantas vezes contribuíram para o sucesso deste trabalho.
- A todas as pessoas que passaram ou que fazem parte da minha existência e de alguma maneira - direta ou indireta - contribuíram para o êxito deste trabalho e meu sucesso pessoal.

RESUMO

A lectina KM^+ , purificada de sementes de *Artocarpus integrifolia*, induz migração de neutrófilos de maneira depende do domínio de reconhecimento de carboidratos e por haptotaxia, sendo esta mediada por interação da lectina com seu glicoligante na superfície de neutrófilos e na matriz extracelular (MEC). Esta atividade foi também descrita por ser parcialmente dependente da desgranulação de mastócitos peritonias. Com o intuito de amplificar os achados que define a lectina KM^+ como molécula capaz de induzir ativação neutrofílica, avaliamos a fosforilação de proteínas intracelulares ocorrida em interação da lectina com glicoligante na superfície de neutrófilos; adesão celular em moléculas de matriz extracelular e aumento da capacidade microbicida destas células. Observamos que KM^+ promove rápida ativação da cascata de fosforilação intracelular observada após 15 minutos da interação da lectina com glicanas na superfície celular. Após 30 minutos de interação, a fosforilação mostrou-se diminuída e na presença de manose, a atividade foi totalmente abolida. KM^+ também participa da adesão de neutrófilos através da interação com glicanas presente na matriz extracelular, principalmente fibronectina. A interação, lectina-neutrófilos, induz aumento da capacidade microbicida, observado através do aumento de fagocitose, bem como aumento do volume lisossomal e da liberação de superóxido. Esses resultados sugerem que KM^+ ativa uma rápida cascata de fosforilação intracelular que pode estar associada à expressão de moléculas de adesão, manifesta pela adesão de neutrófilos em moléculas de matriz. Sugere-se ainda que a interação da lectina na superfície de neutrófilos ativa e proporcionalmente amplifica sua capacidade microbicida. O conjunto de nossos resultados sugere que KM^+ reconheça a porção carboidrato de glicoligante(s) expressos na superfície de neutrófilos e que ao ligar-se

apropriadamente, induz rápida cascata de fosforilação intracelular, aumento de adesão a moléculas de matriz extracelular e aumento da capacidade microbidas destas células, observadas através do aumento da fagocitose, do volume lisossomal e da produção de superóxido.

ABSTRACT

The lectin KM⁺, purified from seeds of *Artocarpus integrifolia*, induces haptotactic neutrophil migration dependent on the CRD, which is mediated by the interaction of the lectin with its glycoligand on the neutrophil surface and in the extracellular matrix. This activity was also described for being partially dependent on the peritoneal mast cell degranulation. In order to expand the characterization of the lectin KM⁺ as a molecule capable of inducing neutrophil activation, we evaluated the phosphorylation of intracellular proteins resulting from the interaction of the lectin with the glycoligand on the cell surface; cell adhesion to extracellular matrix molecules and the increase of the microbicidal capacity of these cells. We observed that KM⁺ promotes rapid activation of the intracellular phosphorylation cascade after 15 minutes of the interaction of the lectin with glycans on the cell surface. After 30 minutes, the phosphorylation was diminished, and in the presence of mannose, the activity was totally abolished. KM⁺ also participates in the neutrophils adhesion through the interaction with glycans in the extracellular matrix, mainly fibronectin. The interaction lectin-neutrophils induces an increase in the microbicidal capacity, observed through the increase of phagocytosis, as well as the increase of the lysosomal volume and the release of hydrogen peroxide. These results suggest that KM⁺ activates a rapid intracellular phosphorylation cascade that might be associated with the expression of adhesion molecules, since KM⁺ significantly induces the neutrophils adhesion to matrix molecules. It is also suggested that the interaction of the lectin on the neutrophils surface activates its microbicidal activity, promoting an increase in phagocytosis; retention of the lysosomal content and the production of hydrogen peroxide. Our results together suggest that KM⁺ recognizes the carbohydrate portion of the membrane, expressed in glycoligand(s) on the cell surface, and that when

connected appropriately, induces a rapid intracellular phosphorylation cascade, an increase of adhesion to extracellular matrix and an increase of the microbicidal capacity of these cells, observed through the increase of phagocytosis, of the lysosomal volume and the production of superoxide.

LISTA DE ABREVIATURAS

MEC – Matriz extracelular

Con A – Lectina concanavalina A

WGA - Lectina de gérmen de trigo

KM+ - Lectina purificada de *Artocarpus integrifolia*

PHA – Fitohemaglutinina

TNF- α - Fator de necrose tumoral-alpha

IL – Interleucina

PWM - *Pokeweed mitogen*

INF γ - Interferon

GM-CSF – Fator Estimulador de Colônia Granulócito Macrófago

Th – Células “T helpers” auxiliares.

NK – Células “natural killers”

MNCF - Fator quimiotático de neutrófilo derivado de macrófago

ICAM – Moléculas de adesão intercelular

PECAM - Molécula de adesão de célula endotelial/plaqueta

GAG – Glicosaminoglicanas

CDR – Domínio de reconhecimento de carboidratos

GPCR - Receptores acoplados às proteínas G

GDP / GTP – Moléculas ligadas à proteína G

PCL - Fosfolipase C

PIP2 - Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

IP3 - Inositol 1,4,5-trifosfato

DG – Diacilglicerol

FAK – Proteína quinase

P13-K – Complexo multimolecular

LPS – Lipopolissacarídeo

VEGF - Fator de crescimento endotelial vascular

PGE₂ - Prostaglandina E₂

TxA₂ - Tromboxano A₂

LTB₄ – Leucotrieno B₄

NAP-2 – Peptídeo ativador de neutrófilos

TLR – “Toll like receptors”

ROS - Espécies reativas de oxigênio

PBS - Solução salina fosfatada tamponada

PMA - Phorbol 12-myristate 13-acetate

fMLP - Formyl-methionylleucylphenylalanine

NBT - Nitroblue tetrazolium

KOH – Hidróxido de potássio

DMSO - Dimetil sulfóxido

ADP – Adenosina difosfato

HOCl - Ácido hipocloroso

RGD - Sequência de aminoácidos Arginina-Glicina-Aspartato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 LECTINAS, PROTEÍNAS DECODIFICADORAS DE INFORMAÇÕES BIOLÓGICAS CONTIDAS EM GLICANAS.	12
1.1.1 Lectinas vegetais – ferramentas importantes em Glicobiologia.	13
1.1.2 Participação das Lectinas Durante o Processo Inflamatório.	15
1.1.3 KM ⁺ – Lectina isolada de sementes de <i>Artocarpus integrifolia</i>	17
1.2. ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS – PRIMEIRA LINHA DE DEFESA CONTRA PATÓGENOS	19
1.2.1 A migração seletiva de neutrófilos ao foco inflamatório	20
1.2.2 A ativação intracelular via proteína G	27
1.2.3 Papel dos neutrófilos ativados em focos inflamatórios.	30
2. OBJETIVOS	36
3. MÉTODOS	37
3.1 OBTENÇÃO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS	37
3.2. OBTENÇÃO DA LECTINA KM ⁺ :	37
3.3. AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS.	38
3.3.1. Fosforilação de proteínas intracelulares:	38
3.3.2 Ensaio de adesão	39
3.4. ATIVAÇÃO DA CAPACIDADE MICROBICIDA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS.....	40
3.4.1 Ensaio de atividade fagocítica.	40
3.4.2 Ensaio de avaliação do volume lisossomal.	40
3.4.3 Dosagem de Superóxido.	41
4. RESULTADOS.....	42
4.1 ATIVAÇÃO NEUTROFÍLICA AVALIADA POR FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS INTRACELULARES.....	42
4.2. ADESÃO DE NEUTRÓFILOS ATIVADOS PELA LECTINA KM ⁺ A GLICOPROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR.	43
4.3. ATIVAÇÃO DEPENDENTE DA INTERAÇÃO COM GLICANAS NA SUPERFÍCIE CELULAR.....	46
4.3.1 Fagocitose	46
4.3.2 Retenção lisossomal.....	47
4.3.3 Produção de Superóxido	48
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÕES	62
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Etapas da migração celular.

Figura 02 – Receptores acoplados a proteína G - proteínas transmembranas que transduzem sinais intracelulares.

Figura 03 – Diapedese - neutrófilos são atraídos até o local da inflamação.

Figura 04 – KM^+ induz ativação de neutrófilos.

Figura 05 - Ensaio de adesão com matrigel (A), fibronectina (B) ou na ausência de moléculas de matriz (C)

Figura 06 – Ensaio de Fagocitose por Neutrófilos ativados por KM^+ .

Figura 07 – Aumento do conteúdo lisossomal em neutrófilos ativados por KM^+ .

Figura 08 – A capacidade de KM^+ induzir a produção de superóxido por neutrófilos humanos.

1. INTRODUÇÃO

1.1 LECTINAS, PROTEÍNAS DECODIFICADORAS DE INFORMAÇÕES BIOLÓGICAS CONTIDAS EM GLICANAS.

Por muitos anos considerou-se que o armazenamento e a transferência de informações biológicas ocorriam apenas com base em ácidos nucleicos e proteínas. As moléculas de carboidratos, que constituem as mais abundantes biomoléculas na natureza, eram relegadas a segundo plano em relação aos nucleotídeos e aminoácidos, sendo consideradas, em geral, como moléculas com função estrutural ou como fonte de energia celular (GABIUS, *et al.*, 2004). Entretanto, pouco a pouco vem se descobrindo que também carboidratos contêm importante e variada gama de informações reguladoras de processos biológicos. A decodificação dessas informações contidas em glicanas é feita por proteínas (ou glicoproteínas) especializadas, denominadas lectinas. Desta forma, pela complexidade das glicanas, conceituar lectinas se tornou uma tarefa árdua por terem essas proteínas ampla diversidade estrutural e funcional. Porém, no Interlec de 2002 (International Lectin Meeting) aceitou-se a descrição apresentada por Van-Damme que diz: “Lectinas são todas as proteínas que possuem pelo menos um domínio de reconhecimento de carboidrato e que se ligam especificamente e de maneira reversível”. Ainda, “ao se ligarem a carboidratos específicos, lectinas não exercem sobre os mesmos, atividade de anticorpo ou enzima” (BARONDES, 1988; AMBROSI *et al.*, 2005). Portanto, as lectinas são importantes ferramentas em Glicobiologia devido à multiplicidade de eventos que podem decorrer de sua habilidade em se ligar a carboidratos. Esta habilidade só foi devidamente explorada segundo a sua importância quando ficou evidente que os oligossacarídeos compreendem um extraordinário sistema de armazenamento de informação biológica, consistindo o

chamado glicocódigo (GABIUS, *et al.*, 2002; RUDIGER & GABIUS, 2001). Uma vez que o reconhecimento de carboidratos é operante em todos os organismos, é natural que os ligantes de carboidratos, ou seja, as lectinas sejam também ubíquas na natureza (SHARON & LIS, 1989; SHARON & LIS, 1993).

A percepção de que as lectinas agem como mediadores do reconhecimento celular em um grande número de sistemas biológicos, como os de adesão de vírus, bactérias e protozoários às células hospedeiras, bem como de leucócitos as células endoteliais e a interação células-matriz extracelular multiplicou o interesse pelo estudo do papel biológico das lectinas. As lectinas, em geral, são consideradas protagonistas na ativação dos vários processos biológicos como, adesão célula-célula, adesão célula-tecido, migração celular, sinalização celular, dentre outros, por interagirem com os glicoconjugados presentes na superfície de diversos tipos celulares e em moléculas de MEC (revisto por LIS & SHARON, 1986). Lectinas multivalentes apresentam ainda a propriedade de aglutinar de hemácias, em certos casos com alta especificidade (LIS & SHARON, 1973; ASKAR, 1986). Certas lectinas reagem especificamente com hemácias dos grupos sanguíneos humanos ABO e MN e subgrupo A1 (SHARON & LIS, 1972), refletindo sua habilidade de ligação com glicanas específicas na superfície celular (DESHPANDE & DAMODARAN, 1990). As lectinas também são responsáveis pela estimulação mitogênica de linfócitos e aglutinação de células cancerosas (LIS & SHARON, 1973; LIENER, 1981).

1.1.1 Lectinas vegetais – ferramentas importantes em Glicobiologia.

As lectinas têm sido amplamente utilizadas na investigação estrutural e funcional de carboidratos complexos e glicoproteínas, bem como para o estudo de alterações decorrentes de processos fisiológicos ou patológicos na superfície celular.

Portanto, o desenvolvimento da Glicobiologia sempre esteve atrelado às pesquisas com lectinas. Embora possam ser encontradas em todos os órgãos da planta (ETZLER & KABAT, 1970; ETZLER & BORREBAECK, 1980; QUINN & ETZLER, 1987), as lectinas produzidas em órgãos de armazenamento, como as sementes, são as mais utilizadas (MOREIRA *et al.*, 1991), por serem mais abundantes.

As lectinas foram descritas e agrupadas de acordo com a família que pertencem e as suas diferentes especificidades. - Família *Leguminosae*, que inclui a concanavalina A (Con A), aglutinina de soja e lectina de lentilha; - Família *Gramineae* (lectinas de cereais, como aglutinina de germe de trigo ou WGA), *Solanaceae* (lectina de batata e tomate) e - *Euphorbiaceae* (ricina). A família das lectinas relacionadas à jacalina inclui proteínas ligantes de N-acetil-D-galactosamina (GalNac), que são encontradas em espécies como *Artocarpus integrifolia* (jaca) e as lectinas de *Maclura pomifera* (“osage orange”). Outros membros dessa família são lectinas ligantes de D-manose/maltose, incluindo KM+ (*Artocarpus integrifolia*) e a lectina de *Calystegia sepium* (revisto por VAN DAMME, *et al.*, 1998).

A importância fisiológica das lectinas está suscitada pelo fato dessas proteínas terem ampla distribuição dentre os vegetais (LIENER, 1976). As funções das lectinas podem ser variadas e sugerem uma relação com os estágios de maturação e germinação das sementes (HOWARD *et al.*, 1972), assim como sugere uma relação com os mecanismos de defesa da planta contra o ataque por fungos (LIENER, 1976). Dentre as aplicações biotecnológicas de lectinas vegetais pode-se citar o isolamento e purificação de glicoconjugados por cromatografia de afinidade, análise de glicomas, modulação da proliferação e ativação celular, detecção de doenças relacionadas à síntese de glicanas, liberação controlada de drogas, diagnóstico e terapêutica em câncer e em doenças auto-imunes, estimulação

mitogênica de linfócitos, investigação de estruturas de carboidratos na superfície celular e de animais, bactérias e vírus (SHARON & LIS, 2004).

Como mencionado, o estudo das lectinas iniciou-se em 1888 com os trabalhos de Stillmark (citado por LIS & SHARON, 1986) quando foi descrito o fenômeno de hemaglutinação por extratos de sementes de mamona (*Ricinus communis*). Porém, uma das funções que mais proporcionou notoriedade às lectinas como ferramentas úteis no estudo de resposta imune foi a de estimular resposta mitogênica em linfócitos T. Esta propriedade foi descoberta em 1960 por Nowell, avaliando o efeito da lectina de *Phaseolus vulgaris* (feijão) ou fito-hemaglutinina (PHA) sobre linfócitos humanos. Outras lectinas com atividade mitogênica foram identificadas, destacando-se a Con-A, a lectina de lentilha, a lectina de “lima bean”, a “pokeweed mitogen” (PWM), a lectina de *Ulex europeus*, a de *Vicia faba* (favina) (revisto por BROWN & HUNT, 1978). Além dessa propriedade, a lectina Con A foi utilizada em um dos estudos pioneiros que demonstrou o seu efeito na liberação de histamina por basófilos humanos (SIRAGANIAN & SIRAGANIAN, 1975) e por mastócitos de roedores (LEUNG & PEARCE, 1984; WYCZOLKOWSKA, *et al.*, 1986), através de sua ligação com oligossacarídeos da IgE ligada ao Fc ϵ RI.

1.1.2 Participação das Lectinas Durante o Processo Inflamatório.

De modo geral todas as células de vertebrados apresentam um glicocálix, uma camada de glicanas associadas a proteínas, lipídeos e glicosaminoglicanos (SCHAUER *et al.*, 1988). Devido à sua complexidade e variabilidade estrutural, as glicanas presentes na superfície celular correspondem a alvos de reconhecimento (SHARON & LIS, 1993) para as lectinas, que decodificam a informação biológica contida nas glicanas.

Um aspecto importante sobre as lectinas é a possibilidade da sua interação com uma variedade de células animais, podendo desencadear alterações no seu metabolismo intracelular. Um interesse em particular nos estudos da resposta inflamatória é a capacidade que certas lectinas possuem em iniciar a liberação de mediadores químicos por mastócitos e basófilos. Alguns agentes desgranulantes são bem conhecidos, como o composto 48/80 (PATON, 1951; JOHNSON & MORAN, 1969), enquanto outros se tornam cada vez mais conhecidos quanto ao seu poder na desgranulação dessas células, como as lectinas Con A (SIRAGANIAN & SIRAGANIAN, 1974; SULLIVAN *et al.*, 1975), galectina-3 (FRIGERI & LIU, 1992) e recentemente KM+ e MNCF (MORENO, *et al.*, 2005). Acredita-se que as lectinas promovam a ligação cruzada entre os receptores de alta afinidade para IgE (FC ϵ RI) na superfície de mastócitos, desencadeando assim o processo de desgranulação e ativação dessas células (FRIGERI *et al.*, 1993; MORENO, *et al.*, 2005).

A interação de uma lectina com glicoconjugados apropriados da superfície dos monócitos/macrófagos, induz não apenas ativação celular, mas também muda o padrão de secreção de citocinas, aumentando o impacto da ligação da lectina. Essa resposta pode modular parâmetros imunitários *in vivo* e *in vitro*. A investigação da atividade anti-tumoral da lectina vegetal *mistletoe*, de *Viscum album*, específica para β -galactosídeos – mostrou que ela induz a secreção de TNF α , IL-1, IL-6, IFN- γ , GM-CSF e IL-10 (HAJTO *et al.*, 1990; MANNEL *et al.*, 1991; HOSTANKA, *et al.*, 1995; RIBERAU-GAYTON *et al.*, 1996; MOCKEL *et al.*, 1997) e mais recentemente foi descrita que a IL-12 está associada com o efeito anti-tumoral induzida pela lectina de *Viscum album* (VAN HUYEN, *et al.*, 2006). A lectina PWM, específica para GlucNac, mostrou-se capaz de induzir a produção de citocinas (PRYJMA *et al.*, 1992): IL-2, TNF α , GM-CSF por células T e IL-1/IL-6 por células acessórias (WALLAYS &

CEUPPENS, 1993); macrófagos de medula óssea murina estimulados com PWM aumentam a expressão de mRNA de G-CSF e IL-6 (TEMELES *et al.*, 1993).

Em 1991, Miranda-Santos e colaboradores demonstraram que o extrato bruto de sementes de *Artocarpus integrifolia* continha duas lectinas, com diferente especificidade a carboidrato, fato que já havia sido relatado em outras espécies de plantas (NICOLSON, *et al.*, 1974; SRINIVASAN, *et al.*, 1986). A lectina ligante de D-galactose originalmente descrita e denominada Jacalina (BUNN-MORENO & CAMPOS-NETO, 1981) quando isolada (ROQUE BARREIRA, *et al.*, 1986) mostrou fraca atividade proliferativa junto à células esplênicas murinas, em fato, jacalina inibe a atividade proliferativa induzida por um mitôgeno clássico como a Con A (MIRANDA-SANTOS, *et al.*, 1991). Atribuiu-se a essa lectina a capacidade de estimular células esplênicas murinas a sintetizar altos níveis de TGF- β , IL-3/GM-CSF e IL-6, não tendo qualquer efeito sobre a secreção de IFN- γ , IL-2 ou IL-4 pelas mesmas células (MIRANDA-SANTOS, *et al.*, 1992; DELGADO, *et al.*, 1993). A atividade mitogênica encontrada no extrato bruto de semente de *A. integrifolia* foi atribuída a uma segunda lectina encontrada, que foi purificada e caracterizada como lectina ligante de D-manose e denominada operacionalmente de **KM⁺** (a letra K, por ser a letra do alfabeto que segue a letra J de jacalina e M⁺ devido à sua capacidade de se ligar a D-manose).

1.1.3 KM⁺ – Lectina isolada de sementes de *Artocarpus integrifolia*.

A lectina KM⁺, também chamada de Artocarpina (recentemente), corresponde a uma proteína constituída de quatro cadeias polipeptídicas de 16 kDa, não covalentemente associadas (ROSA, *et al.*, 1999). Quanto à atividade biológica dessa lectina, demonstrou-se que ela é capaz de induzir migração de neutrófilos *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente descrita como potente indutora da migração de neutrófilos (SANTOS-DE-OLIVEIRA, *et al.*, 1994), sabe-se que a migração induzida pela lectina

KM⁺ ocorre através da montagem de um gradiente haptotático pela ligação de KM⁺ a células endoteliais, células epiteliais, à membrana basal e ao tecido conjuntivo de pulmão de ratos (GANIKO, *et al.*, 2005). Essa ligação é devida a interações da lectina com moléculas de matriz extracelular (MEC) como laminina, fibronectina e glicosaminoglicanos (GANIKO, *et al.*, 2005). Além disso, a migração exercida pela lectina em neutrófilos é parcialmente dependente da ação de KM⁺ na desgranulação de mastócitos com conseqüente liberação de mediadores inflamatórios (MORENO, *et al.*, 2005). Outras propriedades biológicas já foram descritas para essa lectina vegetal como a de promover a ativação de macrófagos e conseqüente indução à produção e secreção de IL-12 (PANUNTO-CASTELO, *et al.*, 2001), citocina que, por sua vez, estimula a secreção de IFN- γ por linfócitos. Esta propriedade foi avaliada em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania major* que após serem inoculados com KM⁺ modificam seu padrão de secreção de citocinas de Th2 para Th1, conferindo proteção contra infecção por esse parasita (PANUNTO-CASTELO *et al.*, 2001).

Recentemente foi avaliada a participação de CXCR2 na migração de neutrófilos induzida pela lectina KM⁺ (PEREIRA-DA-SILVA, *et al.*, 2006). Observou-se que, na presença de toxina *pertussis* ou na presença de anticorpo anti-CXCR2, a migração de neutrófilos induzida pela lectina era diminuída ou totalmente abolida. Além disso, foi observado que KM⁺ promove a modificação da morfologia dos neutrófilos de uma forma esférica de repouso para uma forma polarizada, típica do estado de ativação com a formação de lamelipódio e ondulações na superfície celular. Os complexos formados pela interação da lectina KM⁺ com glicoligantes na superfície de neutrófilos foram rapidamente internalizados. Os resultados sugerem que KM⁺ seja um potente indutor da migração de neutrófilos com participação de

ativação de uma via de sinalização intracelular dependente de proteína G, desencadeada a partir da interação com o receptor CXCR2 (PEREIRA-DA-SILVA, *et al.*, 2006).

Desta forma, pode-se concluir que a interação específica de proteínas com glicanas na superfície celular, bem como, com glicoproteínas de MEC, tem relevância na atividade biológica, pois pode desencadear fenômenos como a adesão, migração e ativação de células de defesa, como macrófagos e neutrófilos, dirigindo-os aos sítios inflamatórios.

1.2. ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS – PRIMEIRA LINHA DE DEFESA CONTRA PATÓGENOS

Os neutrófilos são caracterizados por serem granulócitos típicos de fenômenos agudos da inflamação. São células de imunidade inata, com alto potencial de diapedese, rápida velocidade de migração e a capacidade de provocar necrose tecidual pela liberação de suas enzimas lisossômicas. Na circulação têm formato esférico e após estímulo apropriado, sofrem mudanças em sua forma, fato implicado em sua adesão a células endoteliais e transmigração para o tecido perivascular (ZAFFRAN, *et al.*, 1993). O rolamento dos leucócitos pela vênula pós-capilar é favorecido pela ação das selectinas. Já sua adesão firme ao endotélio é proporcionada por integrinas, que são reconhecidas como uma família dominante de receptores de célula para adesão, que responde por interações de leucócitos com o endotélio e a MEC (WILLIAMS & SOLOMKIN, 1999). Integrinas sinalizam caminhos e medeiam funções importantes em leucócitos, incluindo migração, ativação do *burst* respiratório, adesão de células, secreção de citocinas e apoptose (LARSSON, *et al.*, 2000). Já as citocinas, mediadores químicos inflamatórios, são responsáveis pela expressão de grande parte das moléculas de adesão leucócito-endotélio e

caracterizam-se pela capacidade de coordenar a atividade celular inflamatória influenciando no recrutamento celular pela indução e modulação da expressão de moléculas de adesão (LIPOWSKY, 1996; SPRINGER, 1994). Através de avaliações em modelo animal, detectou-se que o principal atraente de neutrófilos é a quimiocina CXCL-8, fato confirmado pela observação da completa inibição do recrutamento de neutrófilos aos sítios de inflamação, decorrente da neutralização desta quimiocina por anticorpos monoclonais específicos (FOLKESSON, *et al.*, 1995; MATSUMOTO, *et al.*, 1997; SEKIDO, *et al.*, 1993). Outras citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e endotoxinas, induzem a produção de moléculas de adesão intercelular nas células endoteliais possibilitando o aumento da adesão dos neutrófilos (OSBORN, 1990).

Lectinas como galectina-3, MNCF (DIAS-BARUFFI, *et al.*, 1993) e KM+ (SANTOS-DE-OLIVEIRA, *et al.*, 1994; GANIKO, *et al.*, 2005) foram descritas por induzir a migração de neutrófilos pela montagem de um gradiente haptotático. Para cumprirem sua função de forma eficiente, os neutrófilos deixam os vasos sanguíneos através de diapedese e, nos tecidos inflamados, atuam como potentes agentes microbicidas, liberando altas concentrações de agentes tóxicos, como mieloperoxidase, elastase, radicais livres de oxigênio (ROS), incluindo ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (HERSKOWITZ & MANGANO, 1996).

1.2.1 A migração seletiva de neutrófilos ao foco inflamatório

As selectinas constituem uma família de lectinas que reconhecem carboidratos específicos e medeiam o isolamento de neutrófilos e monócitos ao endotélio (JUNG, *et al.*, 1998). Três tipos de selectinas conhecidas foram denominadas de acordo com o tecido no qual foram identificadas: E-selectinas

aparecem nas células endoteliais após terem sido ativadas por citocinas inflamatórias como IL-1, sendo que uma pequena quantidade é encontrada em vários leitos vasculares e parecem ter significado importante para a migração dos leucócitos; L-selectinas encontradas nos leucócitos e responsáveis pelo endereçamento (*homing*) dos linfócitos para os linfonodos; e P-selectinas são armazenadas em alfa-grânulos das plaquetas e corpos de Weibel-Palade (vesículas citoplasmáticas) das células endoteliais, e através de estimulação adequada posicionam-se na membrana plasmática (MARTINS, 2005). Considera-se que, as E-selectinas sejam as principais responsáveis pela adesão dos leucócitos ao endotélio no desencadear de eventos que culminam em processos inflamatórios. Elas são necessárias para a migração de leucócitos, uma vez que, além de mediar a interação fraca de neutrófilos com o endotélio, induzem a expressão de moléculas de adesão como as integrinas e ICAMs. A interação estabelecida por selectinas corresponde ao passo inicial na seqüência de eventos que resultará no extravasamento dos neutrófilos para os sítios de inflamação. O receptor CD66, presente tanto em neutrófilos quanto em células endoteliais, também apresenta papel bem definido nesse processo de adesão endotelial via E-selectinas (KUIJPERS, *et al.*, 1992). Além de facilitar a adesão mediada pelas $\alpha 2$ -integrinas, (KUIJPERS, *et al.*, 1993) também potencializa a formação de espécies reativas de oxigênio (STOCKS, *et al.*, 1995). Feuk-Lagerstedt e colaboradores (1999), através de estudos com neutrófilos humanos e galectina-3 demonstraram a importância do CD66 na indução da ativação do complexo NADPH-oxidase em neutrófilos, após a sinalização intracelular desencadeada pela lectina. À medida que o leucócito diminui sua velocidade por rolamento sobre as células endoteliais, as L-selectinas se despreendem e as integrinas são ativadas por pelo menos uma de uma variedade de

quimiocinas e citocinas quimiotáticas associadas à superfície endotelial (ABITBOL, *et al.*, 2005). (Figura 01). A estrutura funcional das integrinas obedece a uma regra geral onde a subunidade $\beta 1$ medeia interação com componentes da matriz extracelular (BUCK E HORWITZ, 1987; AKIYAMA *et al.*, 1990), enquanto a $\beta 2$ é expressa unicamente nos leucócitos, juntamente com três unidades α , também específicas para leucócitos. (WRIGHT E DETMERS, 1988). Além das integrinas do grupo β -2, PECAM ou CD31 e integrinas do grupo β -1, como CD29/CD49d, podem estar relacionadas à adesão leucocitária, protagonizando essa interação (KUIJPERS, *et al.*, 1992). Esta diferença indica que a expressão de uma integrina não desencadeia necessariamente a adesão, ainda que o seu ligante esteja disponível. Na maioria dos casos, há a necessidade de ocorrer ativação por mediadores solúveis, como hormônios e particularmente por citocinas, ou ainda por proteínas componentes da matriz extracelular (SPRINGER, 1990; HYNES, 1992; LAMPUGNANI & DEJANA, 1997) o que levaria ao aumento de sua afinidade de interação com o ligante. Os agrupamentos de integrinas na superfície celular em complexos de macromoléculas, a ocupação de ligantes específicos e a fosforilação de tirosina são os acontecimentos chave que resultam em processos diversos tais como migração e ativação celular, remodelagem de tecido, proliferação de células, angiogênese, e em células tumorais auxilia na invasão e metástase (HYNES, 1992; SHEN & GUAN, 2001).

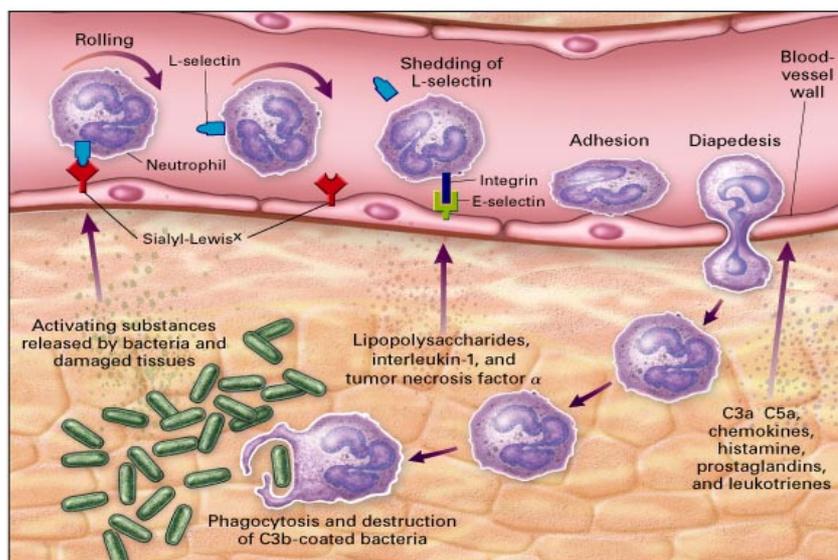


Figura 1 – Esquema das etapas de migração celular. A primeira etapa envolve a união reversível dos leucócitos ao endotélio vascular por intermédio de ações entre selectinas e seus ligantes carboidratos específicos promovendo o rolamento das células migrantes sob o endotélio. Essa ligação não consegue ancorar as células contra a força do fluxo sanguíneo, mas facilita o desencadeamento de interações mais fortes que ocorrem como resultado da indução de ICAM-1 no endotélio e a ativação de seus “contra-receptores” LFA-1 e Mac-1 no leucócito, pelo contato com o quimioatratante. A estreita união entre essas moléculas permite que o leucócito polarize e transmigre de acordo com o gradiente de concentração da quimiocina que proporcionou sua migração. Imagem retirada do site <http://www.chronicprostatitis.com/inflamm.html>

Os quimioatratantes são, de maneira geral, responsáveis pela indução na translocação e a ativação de moléculas como as integrinas CD11b/CD18, que promovem a firme adesão dos neutrófilos às células endoteliais. A expressão de integrinas corresponde a um indicador precoce da ativação dos neutrófilos (ASIMAKOPOULOS, 1998). As integrinas estão envolvidas em eventos de sinalização intracelulares, uma vez que sua cauda citoplasmática constitui sítio para a fosforilação e atua na ligação a proteínas do citoesqueleto (ALPIN, *et al.*, 1998). Os neutrófilos integram os sinais induzidos concomitantemente por ação de

integrinas e citocinas inflamatórias, ativando uma série de eventos intracelulares que resultam na modificação do citoesqueleto, necessária para a migração celular, entre outros (revisto por WITKO-SARSAT *et al.*, 2000). A polarização dos neutrófilos permite que estes se locomovam vetorialmente para o tecido extravascular (SNYDERMAN & GOETZL, 1981; CLARK & BRUGGE, 1995; LAUFFENBURGER & HOWITZ, 1996), num processo de migração. Esse processo de migração, que ocorre através de uma série de etapas coordenadas tanto por moléculas de adesão, como por mediadores solúveis derivados do microambiente local (BRUYNINCKX *et al.*, 2001). A migração de células de defesa é de crucial importância para um vasto leque de fenômenos biológicos, particularmente importantes na resposta inflamatória uma vez que o movimento de leucócito em direção a um tecido inflamado é essencial para a defesa do hospedeiro contra infecção. Inicialmente acreditava-se que o movimento do leucócito dava-se através de um gradiente solúvel (quimiotático), o qual forneceria a orientação para as células migrarem. Entretanto, condições hidrodinâmicas na região da vênula pós-capilar não favorecem a manutenção de um gradiente de substâncias solúveis, pois esse gradiente seria “lavado”, difundir-se-ia e teria que ser repostado constantemente (ROT, 1992; TANAKA *et al.*, 1993). A literatura mais recente fundamenta a idéia da formação de um gradiente de atraentes ligado a substratos sólidos, localizados na superfície do endotélio e na MEC, caracterizando o gradiente haptotático (ROT, 1992; SANTOS DE OLIVEIRA *et al.*, 1994; GANIKO *et al.*, 1998; GANIKO, *et al.*, 2005).

A matriz extracelular apresenta uma estrutura tridimensional formada por um grande número de moléculas diversas que se associam de maneira organizada. A secreção da matriz extracelular pelas células é de fundamental importância para dois eventos: a interação da MEC com a superfície celular e o estabelecimento de pontes

célula-célula. As macromoléculas agrupam-se em três distintos grupos para formar a matriz extracelular: proteínas estruturais fibrosas, como os colágenos e as elastinas, um grupo de glicoproteínas adesivas, incluindo fibronectina e laminina e um gel formado por cadeias de polissacarídeos da classe glicosaminoglicanas (GAGs) que, em geral estão ligadas covalentemente a proteínas, formando proteoglicanas (ALBERTS *et al.*, 1997; COTRAN; KUMAR & COLLINS 2000). A matriz extracelular desempenha várias funções, dentre elas a apreensão de moléculas como a água, para proporcionar turgor aos tecidos e servir como reservatório para fatores de crescimento que controlam a proliferação celular. Fornece também, substrato para a aderência, migração e proliferação das células, podendo influenciar diretamente na forma e função do tecido. A degradação da MEC acompanha a morfogênese e a cicatrização de feridas, bem como a invasão e metástases tumorais (COTRAN; KUMAR; COLLINS 2000). Além desses eventos, as moléculas de matriz estão diretamente implicadas no processo de angiogênese (LOCHTER & BISSELL, 1995). Componentes da matriz extracelular como a laminina e a fibronectina, além de compor e delimitar o microambiente formando barreiras físicas, participam na adsorção de citocinas e quimiocinas proporcionando a interação destas com as células, fato relacionado com a formação do gradiente haptotático de atraentes que é capaz de orientar a migração das células inflamatórias para o local lesado (WESTERMANN *et al.*, 2001; LANNES- VIEIRA, 2003). É proposto que, uma vez no tecido perivascular, a migração de células inflamatórias ocorra através da interação de moléculas de adesão e de receptores expressos na superfície celular com quimiocinas, citocinas pró-inflamatórias, e componentes da MEC, presentes nos focos inflamatórios (revisto por RABINOVICH *et al.*, 1999).

A laminina é a glicoproteína mais abundante na membrana basal; essa funciona como adesina, ligando células basais do epitélio ao colágeno do tipo IV. Relaciona-se diretamente a estágios avançados de diferenciação celular, sendo pré-requisito para diferenciação terminal e execução de funções especializadas. Esses fatos decorrem de sua interação com as integrinas e outros componentes da superfície celular bem como do controle exercido pela laminina sobre a migração celular, polarização, proliferação e apoptose (KOSMEHL H. *et al.*, 1999). A fibronectina desempenha função fundamental na adesão de células à matriz extracelular. São encontradas no sangue como glicoproteínas solúveis, no tecido conjuntivo frouxo e na maioria das matrizes extracelulares mesenquimais. Muitas células (fibroblastos, macrófagos e leucócitos) aderem a fibronectina através do domínio central que apresenta a sequência de reconhecimento RDG (Arg-Gly-Asp) (YAMADA, 1991). Vários domínios nessa glicoproteína apresentam determinantes de ligação específicos para fibrina, heparina, colágeno, integrinas e outras moléculas. O reconhecimento do CDR desempenha um papel chave na adesão entre célula e matriz. A fibronectina é considerada a maior glicoproteína mesenquimal da matriz extracelular; está envolvida na adesão célula-matriz, migração celular, morfogênese, diferenciação e transformação de oncogene (IOACHIM *et al.*, 2002). Além disso, potencializam a sensibilidade de certas células, como as endoteliais, aos efeitos proliferativos dos fatores de crescimento (LOCHTER; BISSEL, 1995). As glicoproteínas tenascina e fibronectina são componentes da membrana basal que desempenham funções competitivas (IOACHIM *et al.*, 2002).

1.2.2 A ativação intracelular via proteína G

Os receptores de membrana, como as integrinas e os receptores para quimiocinas (CXCR1 e CXCR2), possuem domínios citoplasmáticos que ativam as tirosinas quinases localizadas na face citosólica da membrana plasmática. A proteína G, também localizada na face citosólica, permite que após a ativação de uma dessas quinases, esta fosforila outras tirosinas de proteína citosólica alvo constituindo assim o evento de cascata de ativação intracelular (DE ROBERTIS & HIB, 2001). As proteínas G são heterotriméricas, constituídas pelas sub-unidades α , β e γ que desempenham a função de intermediar a transmissão de sinal entre os receptores acoplados às proteínas G (GPCRs) e efetores múltiplos, tais como enzimas e canais iônicos. Os genes que codificam as proteínas G são membros de uma superfamília gênica que codifica proteínas que se ligam a nucleotídeos guanina com alta afinidade e especificidade (SPIEGEL, *et al.*, 1994). As proteínas G são intermediárias essenciais para o mecanismo de transdução de sinal, ligando-se aos diversos GPCRs, localizados na superfície celular (SPIEGEL, 1996). A proteína G ativada sofre uma mudança conformacional de sua subunidade α passando de um estado de GDP-ligada a GTP-ligada, resultando na dissociação desta sub-unidade α das sub-unidades $\beta\gamma$. A sub-unidade α livre pode ativar tanto a fosfolipase C $\beta 1$ (PCL $\beta 1$), quanto PCL $\beta 2$, enquanto o complexo $\beta\gamma$ livre ativa preferencialmente PCL $\beta 2$. A ativação das PCL resulta na hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2) para gerar segundos mensageiros: inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DG). IP3 mobiliza Ca^{2+} das reservas intracelulares, levando a um aumento transitório de concentração, enquanto DG estimula a proteína quinase C (Figura 02). Conseqüentemente, uma variedade de moléculas efetoras são fosforiladas e ativadas, desencadeando assim diversas respostas celulares (BEN-BARUCH, *et al.*,

1995). A ativação e fosforilação de proteínas tirosina quinases, principalmente a FAK, é uma resposta funcional dos leucócitos, que ocorre, a partir das alterações dinâmicas no citoesqueleto de actina, geradas por processos como a adesão ao endotélio e à MEC, bem como a fagocitose (GIANCOTTI, 2000; WILLIAMS & SOLOMKIN, 1999; SIMS & DUSTIN, 2002). A FAK recruta uma variedade de proteínas formando um complexo multimolecular, como a PI3-K. A sinalização via PI3-K regula a migração e proliferação de células imunes, assim como sua sobrevivência e diferenciação (FRUMAN & CANTLEY, 2002). Para os neutrófilos, o papel fundamental deste *pool* de proteínas intracelulares, como a PI3-K, foi demonstrado através de estudos que demonstram ocorrer desorientação na migração de neutrófilos devido à ausência da PI3-K (LI, JIANG, XIE *et al.*2000).

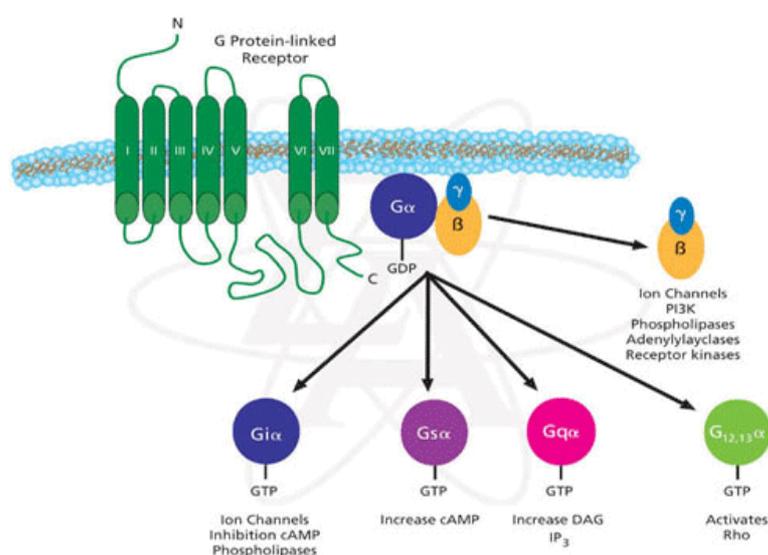


Figura 2 – Receptores acoplados a proteína G são proteínas transmembranas que transduzem sinais intracelulares. Estes receptores exibem uma estrutura comum que consiste em sete domínios transmembranas, com a região amino-terminal voltada para o meio extracelular e a região carboxi-terminal para o meio intracelular. Nessa região encontram-se acopladas as sub-unidades da proteína G. A ativação via esses receptores induz a mudança de GDP em GTP na sub-unidade α da proteína G e a dissociação desta sub-unidade do heterodímero $\beta\gamma$. Dependendo da isoforma, a sub-unidade α de GTP medeia sinalização intracelular indireta, por atuar sobre moléculas efetoras como a adenilil

ciclase (AC) ou em fosfolipase C (PLC), ou ainda de forma direta, regulando canais iônicos ou a função de quinases. Imagem retirada do site: www.sigmaaldrich.com/.../6460/G_protein.gif

As quimiocinas atraentes da sub-família C-X-C, exercem papel chave no tráfego e recrutamento de leucócitos tanto em condições homeostáticas, como inflamatórias (revisão por BAGGIOLINI, 1998). Goodman e colaboradores (1998) avaliaram o espectro de quimiocinas C-X-C que são produzidas por macrófagos alveolares humanos após estímulo com LPS e verificou-se que a quimiocina dominante é IL-8, um potente quimioatraente para neutrófilos. Receptores para IL-8 são glicoproteínas (GROB, *et al.*, 1990; BESEMER *et al.*, 1989) e podem corresponder a potenciais ligantes para lectinas na superfície dos neutrófilos. As sugestões iniciais de que os receptores para IL-8 são glicosilados foram baseadas nas observações de que WGA, lectina específica para *N*-acetilglucosamina e ácido siálico, inibe a ligação de IL-8 à superfície de neutrófilos humanos (GROB, *et al.*, 1990). Estudos futuros mostraram que, assim como acontece com outros GPCRs, a porção extracelular de CXCR2 contém sítios para *N*-glicosilação em resíduos de asparagina. Estes sítios são localizados na parte N-terminal do receptor na asparagina na posição 17 (Asn¹⁷), e no segundo domínio extracelular nas posições Asn¹⁸⁶ e Asn¹⁹⁷ (MURPHY & TIFFANY, 1991). Duas glicoformas distintas têm sido descritas para CXCR2 em neutrófilos; apresentando distribuições distintas. A variante altamente glicosilada de CXCR2 é expressa na superfície celular, enquanto a variante menos glicosilada de CXCR2 constitui um grupo de receptores intracelulares (LUDWING, *et al.*, 2000). Recentemente foi descrito que a lectina KM+ exerce sua propriedade de induzir a migração de neutrófilos por reconhecimento de glicanas contendo manose, especificamente associada à CXCR2, expressa na superfície celular (PEREIRA-DA-SILVA, *et al.*, 2006). Os muitos estudos sobre

GPCRs revelam que a glicosilação não parece influenciar a função desses receptores (STRADER, *et al.*, 1994; RAY, *et al.*, 1998). Este processo pode não estar envolvido diretamente na ligação e função dos receptores, mas a glicosilação em CXCR2 tem sido descrita por ser relevante para a manutenção da expressão do receptor na superfície celular e por proteger o receptor contra proteases derivadas dos neutrófilos (LUDWING, *et al.*, 2000). Por outro lado, e dando suporte à observações sobre a lectina KM+, quando o agonista é uma lectina, um envolvimento direto das glicanas presentes nos receptores na ligação e sinalização celular parece ser necessária (PEREIRA-DA-SILVA, *et al.*, 2006).

1.2.3 Papel dos neutrófilos ativados em focos inflamatórios.

Os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa contra agentes infecciosos que conseguem ultrapassar as barreiras físicas da imunidade inata. São também as primeiras células recrutadas para os locais de infecção ou de dano tecidual. A inflamação envolve a ativação celular através de mediadores químicos específicos que obedecem a uma sequência de acontecimentos unidirecionais que envolvem desde sinalização e ativação até a adesão e migração celular. Os neutrófilos, são células que participam da defesa inata e, nos tecidos, podem estar presentes em todas as portas de entrada do organismo que fazem contato com o meio externo. Com um tempo de vida média na circulação de aproximadamente sete horas (QUESENBERRY & COLVIN, 2001), e a maior parte dos neutrófilos passam esse tempo livre, na corrente sanguínea. Quando necessário, acumulam-se rapidamente no sítio inflamatório. São protagonistas no processo inflamatório e sua participação é multifuncional envolvendo o reconhecimento seletivo do agente agressor, respondendo apropriadamente por meio de locomoção, fagocitose do agente invasor e subsequente destruição desse(s) agente(s) através da produção de

espécies reativas de oxigênio. Para tanto, neutrófilos são dotados da propriedade de secretar substâncias como as citocinas, não só capazes de retardar a disseminação da infecção, mas, quando necessário, também recrutar outros tipos de leucócitos para o sítio inflamatório (CASSATELA, 1995). Assim como os mononucleares, os neutrófilos são células secretoras de citocinas (KASAMA *et al.*, 2005) como TNF- α , fatores angiogênicos como VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e interleucinas, como IL-8. A secreção ocorre em resposta a diferentes estímulos, como LPS e TNF- α (MONTÓN *et al.* 1998). Além disso, neutrófilos ativados podem gerar produtos a partir da cicloxigenase (PGE2 e TxA2) e da lipoxigenase (LTB4) (WEISSMANN, *et al.*, 1982). A IL-8, GCP-2 e NAP-2 são quimiocinas que possuem padrão de indução na migração neutrofilica comparáveis (BRANDT, *et al.*, 1989; WALZ & BAGGIOLINI, 1989) e pertencem à subfamília das quimiocinas CXC. Por sua vez, neutrófilos expressam dois diferentes tipos de receptores, nomeados CXCR-1 e CXCR-2, que interagem com todas as quimiocinas CXC que contêm o *motif* ELR (Glu-Leu-Arg N-terminal) (HOLMES, *et al.*, 1991; MURPHY & TIFFANY, 1991).

No local da inflamação ou infecção, os neutrófilos ligam e ingerem microorganismos invasores através de um processo conhecido como fagocitose. A fagocitose é acionada pela ligação dos patógenos opsonizados por proteínas plasmáticas através de receptores específicos para opsoninas. Alternativamente, a ligação de microorganismos não opsonizados, ocorre através de outras interações, incluindo lectina-glicana (OFEK, *et al.*, 1995). Assim, neutrófilos reconhecem diretamente a superfície ou moléculas secretadas pelas bactérias, incluindo peptideoglicano, lipoproteínas, lipopolissacádeos, dentre outros. Estas moléculas derivadas de patógenos, coletivamente conhecidas como moléculas comuns

associadas à patógenos, interagem diretamente com certo número de receptores de reconhecimento comum expressos na superfície celular, incluindo TLRs (revisto por AKIRA & TAKEDA, 2004). Estudos recentes de Hayashi e colaboradores (2003) demonstram que TLRs 1,2 e 4-10 são expressos em neutrófilos humanos. A ligação de TLRs, especialmente TLRs 2 e 4, ativam vias de transdução de sinais que prolongam a sobrevivência da célula, facilita a adesão (SABROE, *et al.*, 2003) e fagocitose (HAYASHI, *et al.*, 2003), aumenta a liberação de citocinas, quimiocinas e ROS (HAYASHI, *et al.*, 2003; KURT-JONES, *et al.*, 2002; SOBROE, *et al.*, 2003), além de promover a desgranulação (BELLOCCHIO, *et al.*, 2004; LOTZ, *et al.*, 2004) contribuindo, dessa forma, para a atividade microbicida dos neutrófilos (BELLOCCHIO, *et al.*, 2004). Embora os receptores de reconhecimento comum desempenhem papel importante no reconhecimento de patógenos pelos neutrófilos, a eficiência da fagocitose por neutrófilos é potencializada pela opsonização do patógeno com proteínas do soro do hospedeiro, como alguns componentes do sistema complemento ou certas classes de anticorpos. Patógenos opsonizados com anticorpos são reconhecidos por receptores específicos para a região Fc de imunoglobulina presentes na superfície de neutrófilos, como CD23, CD89, CD64, CD32 e CD16 (revisto por KOBAYASHI *et al.*, 2005). A interação de alvos específicos com receptores presentes na superfície de neutrófilos ativa eficientemente a fagocitose de microorganismos (Figura 03).

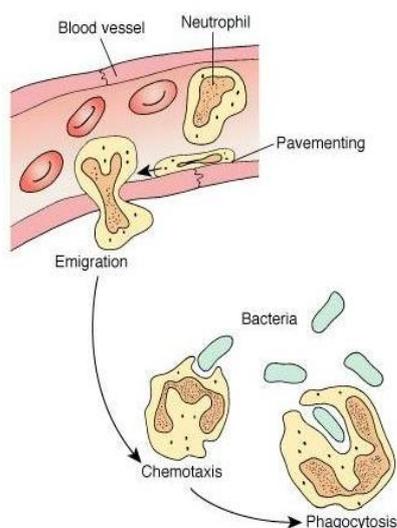


Figura 3 – Por diapedese, neutrófilos são atraídos até o local da inflamação, passando a fagocitar e destruir os agentes invasores. A diapedese e a fagocitose fazem com que os neutrófilos constituam uma linha de frente no combate às infecções. Imagem obtida do site <http://connection.lww.com/Products/porth7e/Ch20.asp>

Dois processos microbicidas são ativados concomitantemente com a fagocitose para criar um ambiente altamente tóxico dentro do fagossomo: (1) a produção de O_2^- dependente da NADPH-oxidase, um precursor de outras espécies reativas do oxigênio e (2) a desgranulação, a qual corresponde a liberação do conteúdo dos grânulos azurófilos (especialmente a secreção de lisossomas) e outros tipos de grânulos dentro do fagossomo (SMITH, 1994). Em neutrófilos, a fusão dos grânulos azurófilos com os fagossomos ocorre muito rapidamente (SUZAKI, *et al.*, 1997; TAPPER & GRINSTEIN, 1997), levando a secreção de enzimas presentes nos grânulos azurófilos no meio extracelular (BORREGAARD & COWLAND, 1997). Além dos grânulos azurófilos, neutrófilos possuem grânulos específicos, os quais têm sido caracterizados como grânulos de secreção com importante papel na iniciação da resposta inflamatória (GALLIN, 1984), enquanto os grânulos azurófilos são vistos como lisossomas particularmente ativos na digestão do material fagocitado

(BAGGIOLINI, 1972; WELSH, *et al.*, 1971). Durante o processo de extravasamento, novos receptores são expostos devido a mobilização de organelas intracelulares para a superfície da célula. Essas organelas são mobilizadas por diferentes vias, e na seguinte ordem: vesículas secretórias são as mais facilmente mobilizadas, seguidas de grânulos de gelatinase e grânulos específicos. Já os grânulos azurófilos são essencialmente retidos durante o processo de extravasamento (SENGELOV, *et al.*, 1995).

Neutrófilos atuam na morte de microorganismos ao produzir altas concentrações de superóxido através da montagem de uma NADPH-oxidase associada a membrana celular, fenômeno conhecido como *burst respiratório*. Historicamente, esta oxidase faz parte de uma maquinaria altamente regulada, restrita a neutrófilos e algumas outras células fagocíticas. Estudos revelam que superóxido e outras espécies reativas do oxigênio (ROS) estão implicados em numerosos processos fisiológicos e patológicos, atuando como mediadores de transdução de sinais intracelulares (revisto por DROGE, 2002). Entre os radicais oxidantes produzidos por neutrófilos após a fagocitose, destacam-se o superóxido e o peróxido de hidrogênio. O superóxido é convertido em peróxido de hidrogênio (dentro dos fagossomos) e este é ligado à mieloperoxidase dos neutrófilos, formando um complexo capaz de oxidar outros compostos (FREEMAN & CRAPO, 1982). Portanto, a produção de espécies reativas do oxigênio tem função vital nos processos imunes. O neutrófilo em repouso consome muito pouco oxigênio, dependendo praticamente da glicólise anaeróbia para seu metabolismo. Quando ativado por estímulo apropriado, após cerca de um minuto, estas células alteram rapidamente seu consumo de oxigênio, atingindo até cinquenta vezes seu consumo basal com aumento significativo na secreção de superóxido e peróxido de hidrogênio

no meio. O sistema básico de defesa contra estes radicais é constituído por antioxidantes simples, que reagem diretamente com os radicais ou sistemas enzimáticos complexos, e os transformam. Destacam-se as superóxidos dismutases que catalisam o superóxido em peróxido de hidrogênio, assim como a catalase e glutathione peroxidase que transformam o peróxido em água. As reações regeneram o oxigênio ao seu estado normal (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

Muitas das funções dos neutrófilos envolvem a interação lectina-carboidrato, como a adesão dos neutrófilos ao endotélio vascular ativado que se inicia pela ação das selectinas que interagem com carboidratos presentes na superfície endotelial (NG-SIKORSKI, *et al.*, 1996). Além disso, o reconhecimento e fagocitose de bactérias na ausência de opsoninas ocorrem através do reconhecimento de glicanas microbianas por lectinas da superfície do neutrófilo, um processo denominado de lectino-fagocitose (OFEK & SHARON, 1988). Lectinas de plantas também exercem atividades biológicas sobre células de mamíferos, mimetizando lectinas de mamíferos e utilizadas para estudar uma variedade de processos biológicos.

2. OBJETIVOS

A lectina vegetal KM+, extraída de sementes de *Artocarpus integrifolia*, foi caracterizada como indutora da migração de neutrófilos por mecanismo haptotático e da desgranulação de mastócitos, fato este que amplifica a migração neutrofílica. Com o intuito de ampliar os achados que define a lectina KM+ como uma molécula capaz de promover ativação da resposta imune inata, objetivamos avaliar o potencial de ativação neutrofílica induzida pela lectina KM+ em fenômenos como:

- Ativação neutrofílica através de fosforilação de proteínas intracelulares.
- Interação das células ativadas com moléculas da matriz extracelular.
- Aumento da capacidade microbicida de neutrófilos por fagocitose; retenção lisossomal e produção de superóxido.

3. MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS

Neutrófilos humanos foram isolados do sangue periférico de indivíduos saudáveis. Para tanto, foi utilizado o meio de separação Mono-Poly Resolving Medium (ICN Biomedicals) conforme descrições do fabricante. Após a separação por meio de centrifugação (1300 rpm por 45 minutos a 22°C), os neutrófilos obtidos foram submetidos a lavagens em PBS estéril e através da coloração com azul de Tripán, foram contados em câmara de Neubauer para determinar o número total de células viáveis.

3.2. OBTENÇÃO DA LECTINA KM⁺:

A lectina KM⁺ foi isolada de acordo com procedimento descrito por Santos-de-Oliveira e colaboradores (1994) e gentilmente cedida pelo Laboratório de Imunoquímica e Glicoimunologia da FMRP-USP. Resumidamente, as sementes de *Artocarpus integrifolia* foram coletadas, lavadas em água e secas por 24 horas a 37°C. Para 100g do pó obtido por moagem das sementes, foi adicionado 1 litro de PBS pH 7.2. A mistura obtida foi incubada por 24 horas, a 4°C, seguindo-se centrifugação a 3000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi coletado e dialisado contra PBS por 48 horas. Para remover a jacalina, lectina majoritária ligante de D-galactose contida no extrato bruto, o mesmo foi submetido à adsorção em coluna de D-galactose acoplada a agarose (Pierce Chemical Company, Rockford, IL, USA). A fração K não adsorvida a resina, foi cromatografada mais quatro vezes em D-galactose imobilizada para garantir que fosse isenta de jacalina. A fração K foi então submetida à cromatografia de afinidade em coluna de D-manose acoplada a agarose (Pierce Chemical Company, Rockford, IL, USA). Após lavagem com PBS, a fração KM⁺, ligada à resina, foi eluída com solução de 0,1M de D-manose em PBS.

A fração KM^+ obtida foi ultrafiltrada contra PBS, usando a membrana YM10 (Amicon Division, W.R. Grace & CO, Beverly, MA) e a preparação final foi armazenada a $-20^{\circ}C$. A concentração de proteínas foi estimada através de leitura de absorvância a 280nm, sendo 1.0 DO 280nm correspondente à concentração de 1 mg/ml. As preparações de KM^+ foram submetidas à análise eletroforética e ensaios de atividade biológica.

3.3. AVALIAÇÃO DA ATIVAÇÃO DE NEUTRÓFILOS HUMANOS.

3.3.1. Fosforilação de proteínas intracelulares:

Neutrófilos (1×10^6 células/ml) foram acondicionados em lamínulas contendo Biobond por 5 minutos e após aderência, foram submetidos a lavagens com PBS. Em seguida, foram incubados com PBS (controle negativo) ou com KM^+ ($10 \mu g/mL$) pré-incubado ou não com D-galactose 0,2M ou com D-manose 0,2M por 0, 15 e 30 minutos. Após lavagens com PBS, as células foram fixadas por 20 minutos com paraformaldeído 2% e novamente submetidas a lavagens com PBS, PBS contendo glicina 0,1M e novamente PBS, para então serem incubadas na presença ou ausência de anticorpo monoclonal anti-fosfotirosina (clone PY20 – BD Transduction Lab, Canadá) diluído em PBS contendo 0.01% de saponina, a temperatura ambiente (T.A), por 45 minutos. Após lavagens com PBS, as células foram novamente submetidas à incubação por 45 minutos com IgG de jumento $[F(ab')_2]$ anti-camundongo conjugado FITC (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), diluído em PBS na presença de saponina 0,01% na concentração de 1:50. Após incubação, as células foram sucessivamente lavadas em PBS, rapidamente lavadas em água MiliQ e montadas em lâminas histológicas com fluormount (EM Science, Fort Washington, PA), para a observação em microscópio de fluorescência Zeiss Axiophot, utilizando o programa de captação Case Data Manager. Para quantificar a

fluorescência após ativação celular, imagens das lâminas (10 de cada) foram capturadas no microscópio de fluorescência e submetidas à análise com o programa Image-Pro Plus.

3.3.2 Ensaio de adesão

Os ensaios de adesão foram realizados em microplacas de cultura de 96 poços. Cada poço foi previamente incubado com fibronectina (250ng/ml) ou matrigel (250ng/ml) diluídas em tampão carbonato de sódio 0,2M pH 9,6 por 16 horas a 4°C. Controle da adesão inespecífica foi avaliada em poços que não continham nenhuma molécula de matriz ou outra proteína qualquer. Em seguida, cada poço foi lavado 4 vezes com PBS e os neutrófilos isolados (1×10^4) foram adicionados aos poços em soluções contendo KM^+ (5, 10 ou 30 $\mu\text{g/ml}$) ou somente PBS. Após 4 horas de incubação a 37°C em estufa contendo 5% de CO_2 , as células não aderidas foram retiradas por 3 lavagens sucessivas com PBS. A camada de células aderidas foi fixada por 10 minutos com metanol e novamente lavada com PBS (3x) sendo então coradas com cristal violeta (0,2% em etanol 2%) por 5 minutos. Após coloração, os poços foram exaustivamente lavados com PBS (10x). As células foram então lisadas com solução de citrato de sódio 0,1M em etanol (1:1). A absorbância foi medida em leitor de microplaca a 550nm, sendo o branco constituído pela solução de lise. O controle negativo da reação foi constituído da absorbância obtida nos poços recobertos com as proteínas de matriz extracelular e contendo células aderidas que foram incubadas somente com PBS. Ainda, para avaliar a dependência da interação lectina-carboidrato, KM^+ foi pré-incubada com D-manose 0,2M ou D-galactose 0,2M antes de ser adicionadas aos poços contendo as células isoladas.

3.4. ATIVAÇÃO DA CAPACIDADE MICROBICIDA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS.

3.4.1 Ensaio de atividade fagocítica.

Neutrófilos isolados (1×10^6 células/mL) foram acondicionados em placas de cultura de 96 poços, e acrescidos dos estímulos KM^+ (5, 10, ou $20 \mu\text{g}$), PMA ($1 \mu\text{g}$) ou IL-8 ($2 \mu\text{g}$) seguido de incubação por 30 minutos a 37°C . Após tempo de incubação, cada poço foi incubado com $10 \mu\text{l}$ de vermelho neutro ($20 \text{ mg}/1 \text{ ml}$ de DMSO) com zimosan ($2,3 \times 10^8$ partículas/ml) por mais 30 minutos, em estufa a 37°C . As placas, após incubação, foram lavadas 2 vezes com PBS a T.A. por centrifugação a 1500 rpm (5 minutos) para remover o excedente do corante e as partículas não fagocitadas. As células foram então fixadas com solução de Baker formol-cálcio (formaldeído 4%, cloreto de sódio 2% e acetato de cálcio 1%) por 30 minutos e em seguida as placas foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm. Ao final da centrifugação foi adicionado $100 \mu\text{l}$ de solução de extração (ácido acético 1%, etanol 50% em água destilada) para a solubilização das partículas, sendo realizada leitura em leitor de microplaca a 550 nm.

3.4.2 Ensaio de avaliação do volume lisossomal.

Neutrófilos foram plaqueados e incubados com os diferentes estímulos como descrito anteriormente (item 3.4.1) para posterior incubação com $20 \mu\text{l}$ de solução de volume lisossomal formada por solução estoque de vermelho neutro associado a DMSO (dimetil sulfóxido P.A. – Sigma) e diluídos em PBS durante 30 minutos a 37°C . Após período de incubação a placa foi submetida à centrifugação por 5 minutos a 1500rpm e imediatamente após o sobrenadante ser descartado, foi adicionada a solução de extração composta por ácido acético (1%) com etanol (50% em água destilada) diluídos em água destilada sendo a placa incubada por mais 30

minutos. A leitura foi realizada em leitor de microplaca em uma absorvância de 550nm.

3.4.3 Dosagem de Superóxido.

Neutrófilos isolados (1×10^6 células/ mL) foram acondicionados em placas de cultura de 96 poços e incubados por 30 minutos com os estímulos descritos anteriormente (item 3.4.1) e acrescidos de 150 μ l de NBT (nitroblue tetrazolium - Sigma); incubados a 37°C, na ausência de luz (para prevenir a foto-oxidação). Após incubação, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 1500 rpm, lavada e novamente centrifugada por mais 5 minutos a 1500 rpm. Descartado o sobrenadante, o sedimento celular foi fixado por 10 minutos com etanol 50% e novamente submetido à centrifugação. A placa foi seca em estufa 60°C, e posteriormente os poços foram adicionados com solução de extração composta por KOH (2M) e DMSO (20 μ L da solução estoque em 5 mL de PBS) numa quantidade de 120 μ l/poço, para a solubilização das partículas. Após incubação de 30 minutos, a leitura da intensidade foi realizada em leitor de placa numa absorvância de 550nm.

4. RESULTADOS

4.1 ATIVAÇÃO NEUTROFÍLICA AVALIADA POR FOSFORILAÇÃO DE PROTEÍNAS INTRACELULARES

Com o objetivo de observar o desencadeamento da cascata de transdução de sinal iniciada pela interação de KM^+ com glicoligantes da superfície de neutrófilos humanos, utilizamos imunomarcção com anticorpo anti-fosfotirosina de células ativadas. A imunomarcção intracelular foi observada em seguida à incubação dos neutrófilos com a lectina KM^+ por 15 (Figura 4 - A) ou 30 minutos (Figura 4 - B) e posterior reação com anticorpo primário anti-fosfotirosina e secundário conjugado FITC, diluídos em solução contendo 0,01% de saponina. Após 15 minutos de incubação dos neutrófilos com a lectina houve intensa imunomarcção, sugerindo que teria ocorrido a ativação da cascata de transdução intracelular (Figura 4 - A). A incubação dos neutrófilos com a lectina por 30 minutos, propiciou a imunomarcção menos intensa, indicando que a lectina induz uma rápida modificação das proteínas intracelulares e sequestro do complexo de fosforilação. Neutrófilos não ativados (tempo 0) não apresentaram nenhuma imunomarcção intracelular (Figura 4 - C), da mesma maneira que neutrófilos ativados com KM^+ e incubados na ausência de anticorpo primário anti-fosfotirosina (dados não mostrados). Sabendo que a lectina vegetal KM^+ é ligante de D-manose, incubamos a lectina com o açúcar específico ou não específico para avaliar a importância da interação lectina-carboidrato na ativação da cascata de fosforilação intracelular. Os resultados, mostrados a partir da quantificação de imunomarcção através do programa Image ProPlus, revelam a inibição da imunomarcção intracelular quando as células foram incubadas com lectina pré-tratada com D-manose, mas não com D-galactose, confirmando a

hipótese de que os CRDs estejam implicados na ativação induzida pela lectina (Figura 4 – D).

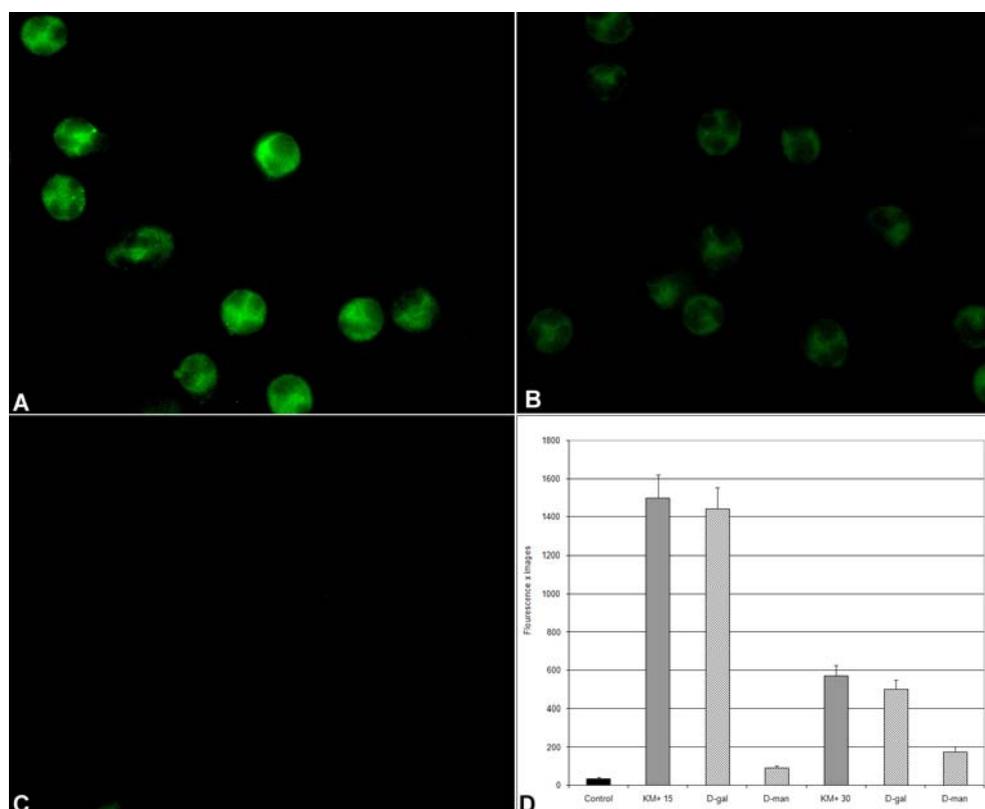


Figura 4 – KM^+ induz ativação da cascata de fosforilação intracelular em neutrófilos humanos. Os neutrófilos foram acondicionados em lamínulas contendo Biobond e incubados com KM^+ (10 $\mu\text{g/mL}$) por 15 min (Figura A), 30 min (Figura B) ou tempo zero, correspondendo ao controle negativo do ensaio (Figura C). Após lavagens com PBS, as células foram fixadas com formaldeído 2% e incubadas com anticorpo monoclonal anti-fosfotirosina, diluído em PBS contendo 0.01% saponina, seguiu-se incubação por 45 minutos com IgG de jumento (Fab'2) anti camundongo conjugado FITC diluído em PBS também na presença de saponina 0,01% na concentração de 1:50. As lâminas foram montadas com fluormount e analisadas por microscopia de fluorescência. Imagens capturadas foram avaliadas pelo programa Image ProPlus para quantificação da imunomarcação em cada ensaio (Figura D). Os dados são apresentados como $p < 0.05$.

4.2. ADESÃO DE NEUTRÓFILOS ATIVADOS PELA LECTINA KM^+ A GLICOPROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR.

Ganiko e colaboradores (2004) demonstram que o estabelecimento de um gradiente de moléculas de KM^+ é viabilizado pela interação da lectina com moléculas de matriz extracelular, como a laminina, fibronectina e heparina, fenômeno este,

necessário para induzir o movimento direcionado de neutrófilos. Com o intuito de avaliar a participação de KM^+ na adesão de neutrófilos a moléculas de matriz, realizamos ensaios utilizando poços de microplacas (96 poços) revestidos com fibronectina ou matrigel. Após incubação de neutrófilos por 4 horas a $37^{\circ}C$ com diferentes concentrações de KM^+ (5, 10, 20 $\mu g/ml$) em poços de microplaca recobertos com matrigel, ficou evidente que a maior concentração de lectina (20 μg) proporciona maior adesão dos neutrófilos à molécula de matriz (Figura 5 - A). Já em poços recobertos com fibronectina, a concentração de 10 μg de KM^+ induziu maior adesão do neutrófilo à glicoproteína (Figura 5 - B). Em comparação ao grupo controle (matriz ausente) observou-se que nenhuma das concentrações testadas, apresentam participação significativa na interação (Figura 5 - C). Resultados negativos semelhantes foram proporcionados por neutrófilos incubados com a lectina KM^+ com D-manose, demonstrando que o açúcar específico inibe a adesão dos neutrófilos à matriz, promovida por KM^+ . Essa idéia foi reforçada pelo fato que a adesão não foi afetada pelo pré-tratamento de KM^+ com D-galactose 0,2M (dados não mostrados).

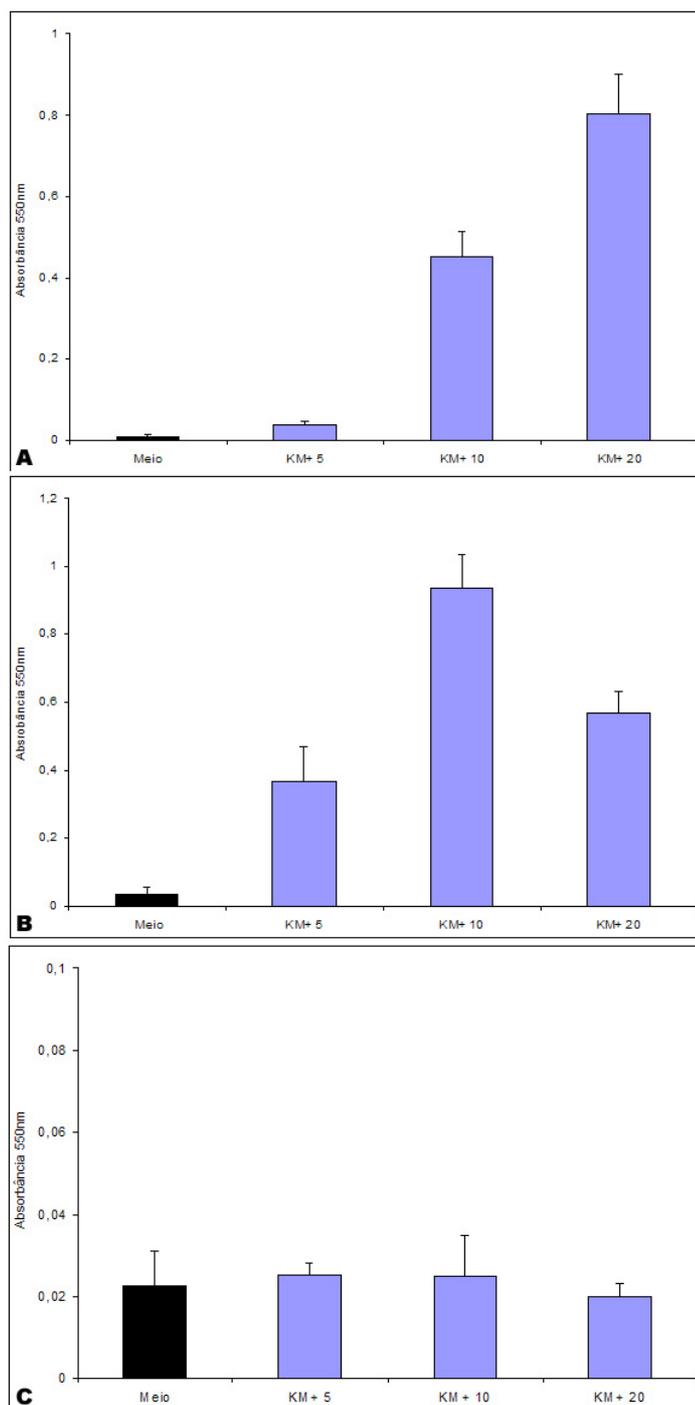


Figura 5 – KM^+ participa na adesão de neutrófilos humanos à moléculas de matriz extracelular. Após a incubação dos neutrófilos por 4 horas a $37^{\circ}C$ com diferentes concentrações de KM^+ (5 μg , 10 μg , 20 μg) em poços de microplaca recobertos com matrigel (A), fibronectina (B) ou na ausência de moléculas de matriz (C), as células aderidas foram fixadas, coradas com vermelho neutro e após sucessivas lavagens em PBS, foram lisadas. A leitura foi realizada em leitor de microplaca em 550 nm. Os dados são apresentados como $p < 0.01$.

4.3. ATIVAÇÃO DEPENDENTE DA INTERAÇÃO COM GLICANAS NA SUPERFÍCIE CELULAR.

No organismo, processo de fagocitose envolve o englobamento de patógenos, que passam a estar contidas numa vesícula – fagossoma - localizada no citoplasma. Os lisossomos, organelas citoplasmáticas de formato esférico, soltos no citoplasma, contêm enzimas hidrolíticas, que estão inativadas pelo pH relativamente alto (básico). O fagossoma se une ao lisossomo formando o fagolisossomo; essa fusão é acompanhada da queda do pH (ácido), decorrente da entrada de prótons vindos do citoplasma; essa acidez ativa as enzimas hidrolíticas, que degradam o patógeno fagocitado.

4.3.1 Fagocitose

Os ensaios de fagocitose foram realizados após neutrófilos serem estimulados com KM^+ (5, 10 e 30 $\mu\text{g/ml}$), PMA (1 μg) ou IL-8 (2 μg) na presença de zimosan (2,3 x 10⁸ partículas/ml) associado a vermelho neutro (20mg/1ml de DMSO). O índice fagocítico foi medido por absorvância (550 nm) do conteúdo celular fagocitado após lise das células estimuladas. Verificou-se que desde as pequenas concentrações (5 μg) de KM^+ é capaz de induzir atividade fagocítica dos neutrófilos. Esta ação é máxima nas concentrações de 10 μg e 30 μg , superando os resultados proporcionados pela ação da IL-8, citocina descrita como potente indutora de fagocitose, o que permite sugerir que a lectina KM^+ seja mais efetiva na potencialização da fagocitose por neutrófilos (Figura 6).

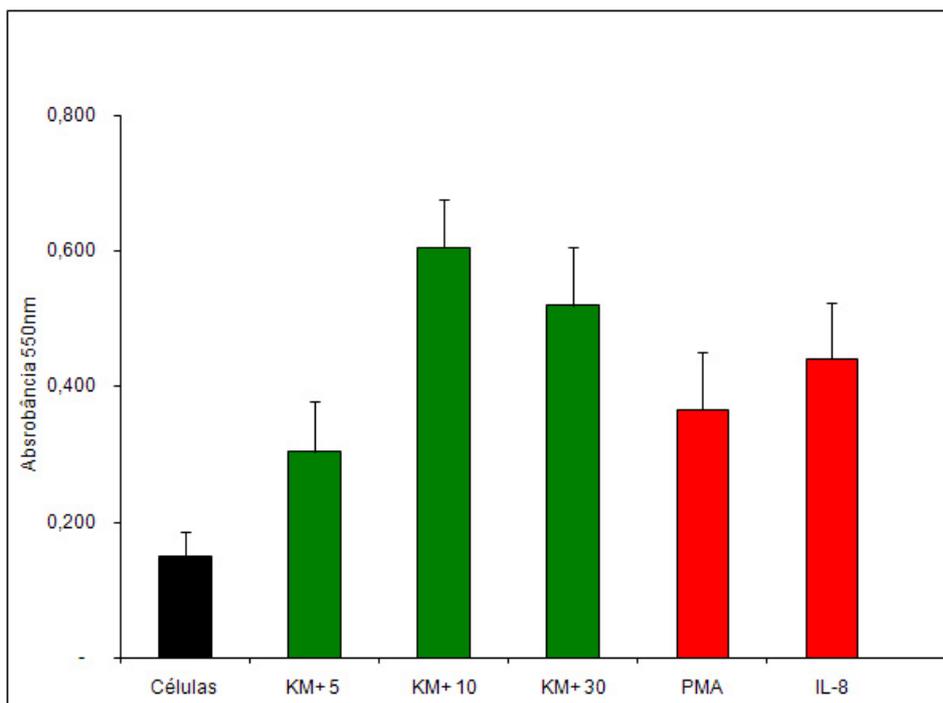


Figura 6 – Neutrófilos ativados por KM^+ promovem eficientemente fagocitose de zimozan por neutrófilos humanos. As células foram incubadas com KM^+ por 30 minutos e em seguida associados a vermelho neutro com zimozan. Após incubação as células foram fixadas com solução de Baker formol-cálcio e as partículas internalizadas e solubilizadas foram quantificadas por leitura de absorbância a 550nm. Os dados são apresentados como $p < 0,05$.

4.3.2 Retenção lisossomal

O processo de fagocitose que proporciona o englobamento de patógenos, a formação do fagossoma, que se localiza no interior do citosol. A formação do fagossoma ocorre concomitantemente com o aumento do volume lisossomal visando iniciar a digestão intracelular. O aumento do volume lisossomal de neutrófilos é avaliado pela retenção de vermelho neutro associado ao DMSO (dimetil sulfóxido P.A. – Sigma) por neutrófilos estimulados com diferentes concentrações de KM^+ , com PMA ou ainda IL-8. O vermelho neutro retido no lisossomo foi quantificado após processo de extração com ácido acético e etanol.

Os resultados indicam que as células estimuladas apresentam volume lisossomal aumentado em comparação com as células não estimuladas, incubadas

somente com PBS (Figura 7). A lectina KM^+ , nas três concentrações utilizadas, provocou retenção lisossomal superior à determinada pelos outros estímulos como já era esperado devido a sua atividade fagocítica também ser diferencialmente aumentada (Figura 7).

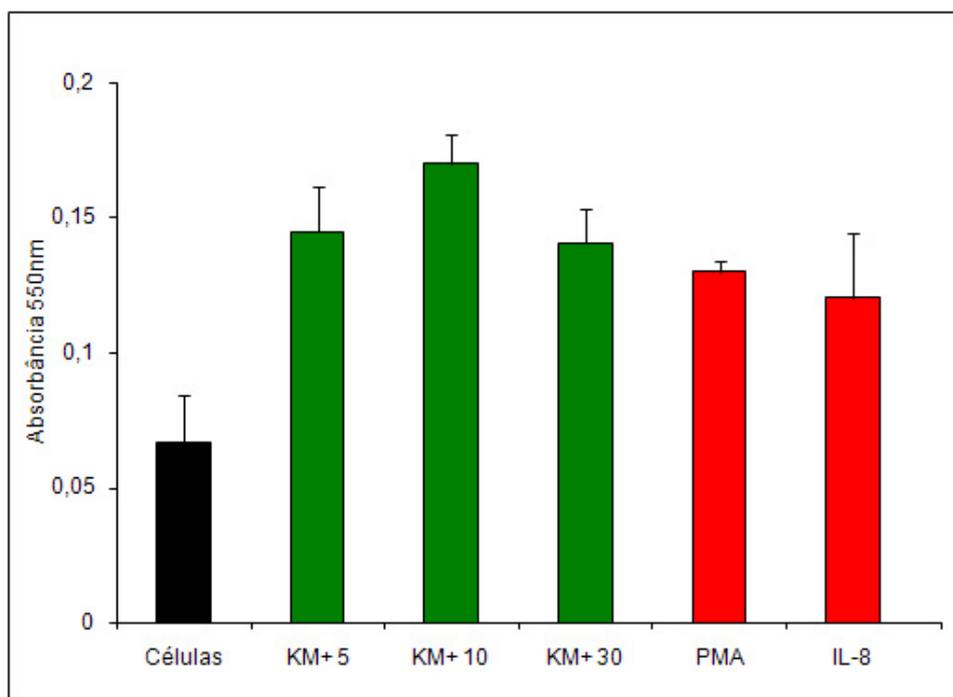


Figura 7 – Neutrófilos aumentam o volume lisossomal após incubação com KM^+ . A apreensão da tintura catiônica de vermelho neutro, que concentra -se nos lisossomos das células, foi usado para avaliar o volume do sistema lisossomal de neutrófilos. Neutrófilos plaqueados com KM^+ e demais estímulos receberam 20 μ l de vermelho neutro e DMSO diluídos em PBS por 30 minutos. Após lise, a absorbância foi lida em 550nm. Os dados são apresentados como $p < 0.05$.

4.3.3 Produção de Superóxido

A produção de superóxido foi mensurada por neutrófilos estimulados com KM^+ (5 μ g, 10 μ g, 30 μ g), PMA (1 μ g) ou IL-8 (2 μ g) e negativo (PBS) na presença de NBT (nitroblue tetrazolium – que é um composto amarelo lipossolúvel que se torna insolúvel e de cor azul no seu estado reduzido - MADHAVI *et al.*, 1994). Como mostra na figura 8, os resultados obtidos demonstram que KM^+ nas concentrações de 5 μ g e 10 μ g induz as maiores liberações de superóxido, diminuindo na concentração mais alta (30 μ g). Assim, KM^+ é mais eficiente na ativação de

neutrófilos do que os controles positivos utilizados (Figura 8). Células não estimuladas, não produzem liberação significativa de superóxido (Figura 8).

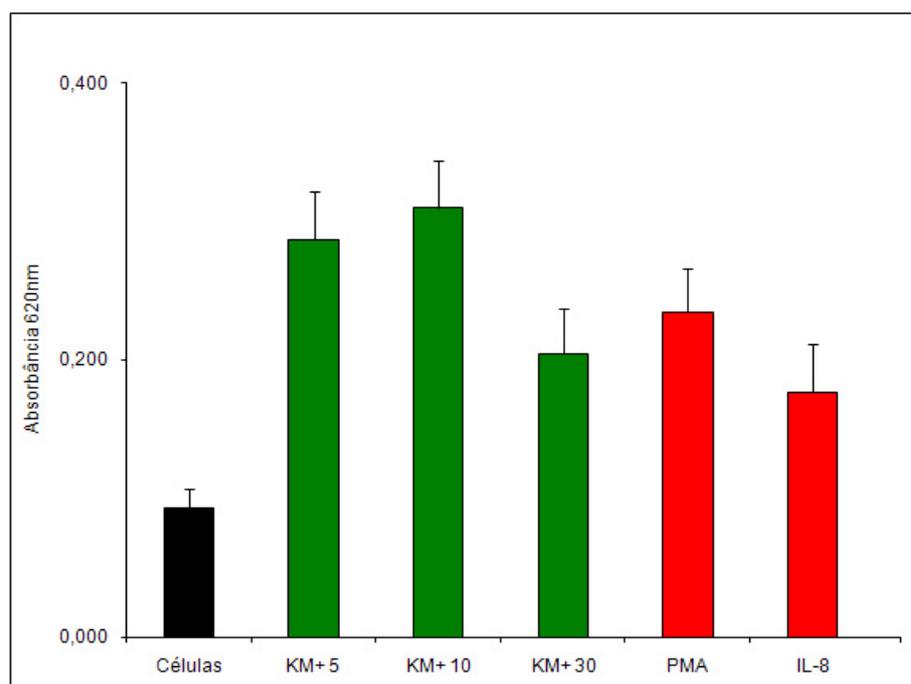


Figura 8 – KM^+ é capaz de induzir a produção de superóxido por neutrófilos humanos. A produção de superóxido foi medida depois da incubação de neutrófilos com KM^+ e demais estímulos associados com NBT (nitroblue tetrazolium) por 30 minutos a $37^{\circ}C$. A absorbância foi medida em 550nm. Os dados são apresentados como $p < 0.05$.

5. DISCUSSÃO

Nos últimos vinte anos, estudos vêm focalizando os neutrófilos como células de vigilância imune, de forma semelhante aos macrófagos, por ter as suas funções altamente reguladas por citocinas liberadas por outras células como mastócitos, queratinócitos, macrófagos, linfócitos CD4⁺ e os próprios neutrófilos (KURITA, *et al.*, 1999; SULLIVAN, *et al.*, 1993; RIBEIRO, *et al.*, 1991). Essas citocinas podem aumentar a quimiotaxia de neutrófilos aos sítios inflamatórios, a atividade fagocítica, a produção de radicais livres do O² e a liberação de enzimas lisossomais, que juntos, resultam em um aumento da atividade citotóxica, bactericida e mesmo fungicida dessas células. Esses achados fizeram com que o papel dos neutrófilos nas várias infecções fosse reavaliado no sentido de considerar uma participação mais dinâmica e efetora dessas células, tanto em uma fase precoce, em que representaria um dos componentes da resposta imune inata, como em fases posteriores, participando indiretamente da resposta imune específica. Os neutrófilos são as primeiras células do sangue a migrarem através do endotélio para o sítio de inflamação e prevenir a invasão por microorganismos. Desta forma, estudos que visam avaliar novos agentes capazes de ativar uma resposta eficiente de neutrófilos tem sido a grande proposta para o desenvolvimento de novas estratégias para a ativação do sistema imune inato.

No presente trabalho observamos a ativação de sinalização intracelular culminando na ativação da capacidade microbicida de neutrófilos induzida pela lectina vegetal KM+, já descrita como indutora de migração de neutrófilos. Observamos que KM+, ao se ligar à glicoligante(s) presente(s) na membrana plasmática de neutrófilos, é capaz de ativar uma cascata de sinalização intracelular que culmina com o aumento da capacidade adesiva em moléculas de matriz

extracelular, como também com o aumento da capacidade microbicida destas células, observado pelo aumento da capacidade fagocítica; o aumento do volume lisossomal e a produção de superóxido.

O acúmulo de neutrófilos em foco inflamatório e a sua ativação estão relacionados à secreção local de fatores quimiotáticos. $KM+$ foi extensivamente descrita como molécula que mimetiza a ação de outras lectinas endógenas, principalmente MNCF, por sua potente capacidade indutora da migração neutrofílica por mecanismo haptotático (GANIKO, *et al.*, 2005), ação esta depende do reconhecimento de carboidratos e parcialmente dependente da desgranulação de mastócitos induzida pela própria lectina (MORENO, *et al.*, 2003). Algumas quimiocinas, incluindo a conhecida IL-8, foram identificadas como potentes ativadores de neutrófilos, induzindo adesão, transmigração através do endotélio, quimiotaxia, *burst* respiratório e desgranulação lisossomal (ROLLINS, 1997). Assim como a IL-8, outras quimiocinas com padrão de atividade comparável junto aos neutrófilos como o peptídeo ativador de neutrófilos derivado de plaquetas-2 (NAP-2) (BRANDT, *et al.*, 1989; WALZ & BAGGIOLINI, 1989), pertencem à subfamília das quimiocinas CXC. Por sua vez, neutrófilos expressam dois diferentes tipos de receptores, nomeados CXCR-1 e CXCR-2, que interagem com todas as quimiocinas CXC que contêm o *motif* ELR (Glu-Leu-Arg N-terminal) (HOLMES, *et al.*, 1991; MURPHY & TIFFANY, 1991). Os receptores CXC são membros da superfamília de receptores de membrana que traduz sinais para o interior da célula pela ativação via proteína G. Esses receptores possuem uma topologia estrutural que compreende sete domínios transmembrana separados por três regiões extracelulares e três regiões intracelulares. As regiões extracelulares formam domínios nos quais ligantes específicos podem interagir e/ou ligar. Sob ligação opositora, CXCR ativa a hidrólise

de fosfoinositol mediado por proteína G para gerar diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato, e assim, ativando uma série de proteínas tirosinoquinases e mobilizando cálcio para iniciar uma variedade de respostas celulares (WU, *et al.*, 1993). Esses eventos são acompanhados pela endocitose do receptor e/ou reciclagem do mesmo (MUELLER *et al.*, 1997).

Com o objetivo de observar se a interação de KM^+ com glicoligante(s) da superfície celular era capaz de desencadear uma cascata de transdução de sinal avaliamos a fosforilação de tirosina. Nosso estudo revela a mobilização de proteínas relacionadas à cascata de ativação intracelular após a interação de neutrófilos humanos com a lectina KM^+ , através de métodos de imunofluorescência. A imunomarcagem intracelular foi observada após ativação dos neutrófilos pela lectina KM^+ por 15, com intensa imunomarcagem e por 30 minutos, com diminuição da imunomarcagem intracelular (Figuras 4 - A e B, respectivamente). Os resultados sugerem que a ligação da lectina com o(s) glicoligante(s) da superfície dos neutrófilos propiciou rápida ativação da cascata de transdução intracelular, com rápido seqüestro de moléculas de ativação intracelular. Para avaliar se a ativação observada era dependente dos domínios de reconhecimento de carboidratos, a lectina KM^+ foi pré-tratada com D-manose 0,2M ou ainda com D-galactose 0,2M. Os resultados revelam que há dependência dos CRDs uma vez que a pré-incubação com carboidrato específico (e não com carboidrato inespecífico) inibe a fosforilação de proteínas intracelulares, observada por ausência de imunomarcagem (Figura 4 - D), situação semelhante a observada em células não estimuladas (Figura 4 - C). Estes resultados corroboram com estudos anteriores que revelam que a atividade de KM^+ é dependente dos CRDs (GANIKO, *et al.*, 2005; DIAS-BARUFFI, *et al.*, 1995). Recentemente foi descrito que neutrófilos incubados com anticorpo monoclonal anti-

CXCR2 previamente ao estímulo com KM+, inibe a migração *in vitro* em 50% quando comparado à migração induzida pela lectina em neutrófilos incubados somente com PBS. Similar inibição foi observada quando neutrófilos foram incubados com uma mistura de anticorpos monoclonais anti-CXCR1 e anti-CXCR2, enquanto o tratamento prévio dos neutrófilos somente com anticorpo monoclonal anti-CXCR1 não teve efeito inibitório na migração de neutrófilos induzida pela lectina KM+ (PEREIRA-DA-SILVA *et al.*, 2006). Como a maioria dos receptores ligados à proteína G, a porção extracelular de CXCR-2 contém sítios para glicosilação em resíduos de asparagina (*N*-glicosilação). Em geral, oligossacarídeos nos receptores de superfície celular podem influenciar sua mobilização na superfície das células como também à sua resistência à proteólise (RADEMACHER & DWEK, 1989; PAULSON, 1989). Já foi relatado que a total *N*-glicosilação de CXCR-2 é essencial para a manutenção de sua expressão por proteger o receptor do ataque proteolítico (LUDWIG, *et al.*, 2000).

Outro aspecto da ativação de neutrófilos via receptores ligados à proteína G é a sensibilidade que esses receptores possuem na presença da toxina pertussis. A toxina pertussis é uma endotoxina produzida pela bactéria *Bordetella pertussis*. Apresenta atividade ADP-ribosiltransferase que catalisa ADP-ribose de NAD para a proteína ligante de GTP (proteína G) em células eucarióticas e também possui algumas funções biológicas como a ativação de plaquetas e a mitogenicidade de linfócitos (BANGA, *et al.*, 1987; TAMURA, *et al.*, 1982). Norgauer e colaboradores (1988) demonstraram que a toxina botulínica C2, que especificamente ADP-ribosila a actina G, é capaz de inibir a montagem da actina e os movimentos de polimorfonucleares. Neutrófilos pré-tratados com toxina pertussis tem a migração *in vitro* induzida pela lectina vegetal KM+ completamente abolida (PEREIRA-DA-

SILVA, *et al.*, 2006), o que juntamente com nossos achados, sugere que ao se ligar à receptores glicosilados na superfície de neutrófilos, KM^+ é capaz de induzir a ativação de uma cascata de fosforilação intracelular. Portanto, o conjunto de informações sugere que a interação da lectina com o(s) glicoligante(s) específico(s) na superfície de neutrófilos induz ativação celular, que rapidamente leva a fosforilação de proteínas intimamente ligadas à cascata de ativação mediada pela proteína G heterotrimérica.

A importância da interação de mediadores químicos com receptores específicos da superfície de neutrófilos para desencadear a cascata de transdução de sinais, resulta na indução do *burst* respiratório, reorganização do citoesqueleto de actina (OMANN, *et al.*, 1987; ROSSI, *et al.*, 1983) e expressão de receptores de adesão (LILES, *et al.*, 1995; NATHAN, 1987; RICHTER, *et al.*, 1990; SHAPPELL, *et al.*, 1990). Sob condições que levam a adesão celular, Takami e colaboradores (2000) observaram rápida fosforilação de tirosina de proteínas intracelulares. A lectina KM^+ descrita como potente indutora na migração de neutrófilos (DIAS-BARUFFI, *et al.*, 1995), possui também atividade na montagem de um gradiente haptotático pela ligação de KM^+ a células endoteliais, células epiteliais, à membrana basal e ao tecido conjuntivo de pulmão de ratos (GANIKO, *et al.*, 2005). A hipótese de que lectinas possam ativar e induzir migração seletiva de células circulantes foi suscitada pela descrição de que a lectina MNCF, ligante de D-galactose, induz a migração de neutrófilos por mecanismo haptotático devido sua interação com laminina (DIAS-BARUFFI, *et al.*, 1995a; DIAS-BARUFFI, *et al.*, 1995b). Ganiko e colaboradores (2005), a partir de um conjunto de resultados, sugerem que a interação de KM^+ com laminina, fibronectina e heparina viabilizam o estabelecimento e a manutenção de um gradiente de moléculas de KM^+ , fenômeno necessário para

induzir o movimento direcionado de neutrófilos. A dependência da interação lectina-glicana fundamenta a proposta de um modelo claro da haptotaxia de neutrófilos, como fenômeno próprio da inflamação aguda. Nossos resultados demonstram que na presença da lectina KM^+ ocorre aumento da adesão de neutrófilos a moléculas de matriz de maneira diferenciada revelando maior interação neutrófilo- KM^+ -fibronectina (Figura 5 - B) do que com matrigel (Figura 5 - A). Este evento é dependente da interação com glicanas da superfície de neutrófilo e/ou glicanas da matriz extracelular uma vez que na presença de carboidrato específico a adesão induzida por KM^+ foi abolida (dados não mostrados), revelado pela ausência de adesão comparável a observada em células não estimuladas (Figura 5 - C). Ottonello e colaboradores (1998) concluem em seu trabalho que glicoproteínas de matriz extracelular, especialmente fibronectina, ditam a resposta de neutrófilos a mediadores solúveis (TNF, GM-CSF e fMLP), mas não a imunocomplexos. Os autores sugerem que este fenômeno parece ser um mecanismo de grande repercussão biológica por identificar o risco de reações celulares a mediadores que são capazes de se difundir facilmente nos tecidos, gerando assim, danos teciduais durante doenças inflamatórias. Os resultados destes autores revelam ainda que os mediadores foram capazes de induzir alta produção de O_2^- em neutrófilos aderentes a fibronectina mas não a laminina. A galectina-3 foi descrita primeiramente por ser capaz de mediar à adesão de neutrófilos à laminina por um mecanismo independente de integrinas (KUWABARA & LIU, 1996) sugerindo que galectina-3 possa ligar a glicoproteínas de superfície de neutrófilos e a oligossacarídeos da laminina. Já a adesão de neutrófilos a fibronectina, mediada por essa lectina, ocorre através de um mecanismo dependente da expressão de integrinas $\beta 2$ na superfície de neutrófilos. Nossos resultados sugerem que KM^+ aumenta a adesão de

neutrófilos à matriz extracelular via ponte de interação entre célula-matriz ou por aumento da expressão de moléculas de adesão, porém nenhum achado indica se a lectina KM⁺ na presença de diferentes moléculas de matriz, atuaria de forma diferenciada na ativação destas células.

Após a ativação e migração ao sítio inflamatório, os neutrófilos atuam na defesa do organismo através de sua capacidade microbicida, que compreendem a fagocitose, desgranulação e produção de mediadores anti- e pró-inflamatórios (SEGAL, 2005). O processo de fagocitose inclui a ingestão do patógeno e digestão do mesmo por ação de oxidantes e enzimas líticas, da produção de mediadores pró-inflamatórios (IL-1, IL-6 e IL-8, ativador de plasminogênio, TNF- α), os quais contribuem para o recrutamento de novas células ao foco inflamatório. Além disso, os neutrófilos auxiliam na remoção de células mortas, de corpos celulares, e na remoção de tecidos lesionados (JANSEN *et al.*, 1999). A fagocitose é acompanhada de um conjunto de alterações metabólicas nas células fagocíticas, denominado “burst” respiratório (VAN EEDEN *et al.*, 1999). Em nosso estudo observamos que KM⁺ foi capaz de induzir aumento da capacidade fagocítica em neutrófilos de forma mais eficaz quando comparado aos resultados obtidos por estímulos já conhecidos como IL-8 ou PMA (Figura 6). Loyola e colaboradores (2002) avaliaram a resposta fagocítica de neutrófilos e macrófagos frente a ativação por Con-A. Os autores utilizaram ratos infectados com *Candida albicans* e após 2 dias da administração intraperitoneal de dose única de Con-A observaram que a proporção de neutrófilos no lavado peritoneal foi de 45% com decréscimo de atividade microbiana em 5% e que após 4 dias 95% das células do lavado eram macrófagos com *clearance* total. Estes resultados suportam a hipótese que a ativação da imunidade celular por Con-A ocorre em duas fases, uma imediata dominada por neutrófilos, e a outra por

macrófagos, ambos com atividade fagocítica acentuada. A lectina de *Viscum album* também é capaz de modular a ativação de fagocitose neutrofílica de maneira independente de eventos de fosforilação (PELLETIER, *et al.*, 2001). Como já descrito, a interação de KM⁺ na superfície de neutrófilos ativa uma cascata de fosforilação intracelular. Esta interação também promove o aumento da capacidade fagocítica destas células.

Durante a fagocitose, muitos sistemas enzimáticos antimicrobiano são ativados dentro das vesículas fagocíticas em neutrófilos com o intuito de matar e digerir patógenos e/ou substâncias fagocitadas. Os neutrófilos possuem grânulos lisossômicos que liberados, contribuem para a resposta inflamatória, e assim como os macrófagos, possuem entre outras enzimas lisossômicas as hidrolases ácidas, as collagenases e as elastases. As hidrolases ácidas têm a função de destruir bactérias e restos de materiais em pH ácido, dentro dos lisossomos. As collagenases e as elastases são capazes de degradar vários constituintes extracelulares como o colágeno, a membrana basal, a elastina e a cartilagem causando destruição tissular (ROIT *et al.*, 1996). A partir dos achados referentes aos experimentos de fagocitose, realizou-se também a avaliação do conteúdo lisossomal. Nossos resultados indicam que as células estimuladas com KM⁺ apresentam volume lisossomal aumentado quando comparado às células não estimuladas. A lectina KM⁺ induz a atividade fagocítica em neutrófilos sendo esta atividade confirmada através do aumento do volume lisossomal (Figura 7).

Após o evento da fagocitose, dois processos microbicidas são ativados concomitantemente: a produção de O₂⁻ e a desgranulação lisossomal, que libera as enzimas contidas em seu interior diretamente ao fagossomo. O leucotrieno B₄ é um metabólito do ácido aracdônico que se apresenta importante na atração de

neutrófilos por quimiotaxia e estimula a ativação destas células com conseqüente liberação das enzimas lisossômicas e a produção do ânion superóxido, fatores fundamentais na defesa do organismo (FORD-HUTCHINSON, & BRAY, 1980). A lectina WGA é capaz de induzir a capacidade microbicida em neutrófilos observado pela produção de reativos de oxigênio e desgranulação, processos que podem modular a resposta inflamatória (KARLSSON, 2002). Os grânulos em neutrófilos ativados são mobilizados em diferentes níveis, vesículas secretoras são rapidamente mobilizadas, seguido por grânulos de gelatinases e os grânulos específicos, enquanto os grânulos azurófilos são essencialmente retidos durante o processo de desgranulação (SENGELOV, *et al.*, 1986). Esta mobilização dos grânulos de secreção em neutrófilos pode ser mediada por sinalização direta de selectinas (WADDELL, *et al.*, 1994; CROCKETT-TORABI *et al.*, 1995) ou por mediadores inflamatórios liberados pelo endotélio ativado (JEANNIN *et al.*, 1994; PATEL, *et al.*, 1994). Nossos achados revelam que KM⁺ é eficiente em promover a adesão de neutrófilos humanos à moléculas de matriz, como também em promover aumento do volume lisossomal, o que pode sugerir uma mobilização de grânulos secretores. Estas atividades em conjunto podem contribuir com uma melhor eficácia na ativação funcional dos neutrófilos pela lectina KM⁺, sendo até mais eficiente quando comparados a estímulos conhecidos como IL-8 ou PMA (Figuras 6 e 7).

Como já citado, o recrutamento de neutrófilos da circulação é estimulado por fatores quimiotáticos, liberados no sítio inflamatório, incluindo produtos da ativação do complemento. Estas células de defesa, obedecendo ao estímulo da fagocitose, sinalizam a ativação da NADPH oxidase de membrana, responsável pelo “burst” respiratório (FREUDENBERG, *et al.*, 1992). O principal mecanismo de morte induzido por neutrófilos, usado na digestão intracelular é o sistema mieloperoxidase-hialida,

no qual o neutrófilo forma compostos moleculares como o HOCl-, que oxida intensamente as moléculas do microorganismo fagocitado (FORTE, *et al.*,2002). Durante o processo de fagocitose as células envolvidas têm significativamente aumentado o consumo de oxigênio molecular. Este súbito aumento do consumo de oxigênio é chamado de “*burst* respiratório”. Simultaneamente ocorre o aumento no metabolismo da glicose nas células pelas vias das pentoses-fosfato (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

O referido metabolismo oxidativo dos neutrófilos é mediado por um complexo enzimático, associado à sua membrana citoplasmática e à membrana dos grânulos específicos - a NADPH oxidase. Tal complexo está dormente na célula não estimulada, podendo ser rapidamente ativado, quando os fagócitos são expostos a estímulos adequados. Baldrige & Gerard foram os primeiros a descrever o aumento do consumo de oxigênio pelos neutrófilos, durante a fagocitose (ERTEL, *et al.*, 1997). A investigação dos mecanismos bioquímicos, envolvidos na fagocitose estimulou Sbarra & Karnovsky, às observações de que o aumento do consumo de oxigênio ocorria, ainda que na presença de inibidores da respiração mitocondrial. Em 1964, Rossi & Zatti demonstraram que o “*burst*” respiratório nos neutrófilos estava associado à ativação da NADPH oxidase. A ausência da atividade desta oxidase foi observada em fagócitos de pacientes com doença granulomatosa crônica, os quais apresentavam uma pré-disposição grave a infecções piogênicas (FESSLER, *et al.*, 2004). A ativação do metabolismo oxidativo, resultando na produção de ânion superóxido (O₂⁻) e derivados (FEUK-LAGERSTEDT, *et al.*, 1999), associada à degranulação, levam à destruição das partículas fagocitadas com o desenvolvimento de uma resposta inflamatória (FREUDENBERG, *et al.*, 1992). Portanto, as espécies reativas de oxigênio podem exercer papel importante nos processos oxidantes

microbicidas, bem como mediadores da inflamação e lesão tecidual. A maior parte do oxigênio consumido durante as atividades fagocitárias e secretórias dos neutrófilos e macrófagos é convertida diretamente em ânion superóxido pela NADPH-oxidase, que é rapidamente convertido em peróxido de hidrogênio e radical hidroxil (TERR, *et al.*, 2001).

Uma vez que a lectina KM⁺ demonstrou ativar funções características da atividade microbicida de neutrófilo, avaliamos sua capacidade em produzir superóxido. Nossos resultados corroboram com os demais achados, relacionando KM⁺ como um potente indutor de atividades funcionais em neutrófilos ao induzir a produção de superóxido em escala crescente conforme as concentrações utilizadas (Figura 8). Já é reconhecida a estimulação da atividade da NADPH-oxidase (inativa em células em repouso) por uma grande variedade de compostos como o PMA (forbol 12-miristato 13-acetato), ácidos graxos insaturados, concanavalina A, análogos do peptídeo bacteriano fMLP (n-formil-metionil-leucil-fenilalanina), zimosan, o látex e bactérias opcionizadas ou não (HENDERSON & CHAPPELL, 1996). Nossos achados corroboram com os dados da literatura e amplificam as características já descritas para a lectina KM⁺ uma vez que esta apresenta capacidade de aumentar a resposta de neutrófilos, até mesmo de maneira superior aos controles positivos utilizados. Outros agentes indutores da produção de ROS incluem interferon gama (IFN- γ), o lipopolissacarídeo (LPS) e o muramil dipeptídeo da parede celular bacteriana, os quais também potencializam a resposta destas células ao estímulo do qual originou o “burst” respiratório (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). A galectina-1 também é capaz de promover a ativação da NADPH-oxidase, levando ao “burst” respiratório em neutrófilos pré-tratados com fMLP (*in vitro* ou *ex-vivo*) (ALMKVIST *et al.*, 2002). Porém, esta atividade em neutrófilos induzida por

galectina-1 ocorre apenas em neutrófilos primados com fMLP e isto parece estar associado à capacidade de fMLP provocar alterações nos ligantes neutrófilicos de galectina-1 na superfície dessas células (DIAS-BARUFFI *et al.*, 2003; ALMKVIST *et al.*, 2002).

O conjunto de resultados apresentados corrobora com trabalhos anteriores na demonstração da capacidade de atuação da lectina KM⁺ como uma molécula com múltiplas funções, colaborando ainda com a visão já conhecida do uso de lectinas vegetais como ferramentas no estudo da ativação de resposta imune inata.

6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados nos permitem concluir que:

1) A interação de KM⁺ em glicoligante(s) presentes na superfície de neutrófilos humanos associa-se a:

- Ativação da fosforilação de proteínas intracelulares;
- Aumento da adesão dos neutrófilos à moléculas de matriz extracelular, com ênfase a fibronectina.
- Ambas atividades dependentes dos domínios de reconhecimento de carboidratos.

2) KM⁺ induz ativação funcional em neutrófilos humanos, fenômeno associado a:

- Aumento da capacidade fagocítica de neutrófilos;
- Aumento do volume lisossomal;
- Produção de superóxido.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABITBOL, R.; FONSECA, M.; SANTOS, L.; FERRARONI, N. Papel das Selectinas na Atividade Inflamatória. **Universidade Severino Sombra**, 2005.
- AKIRA, S. & TAKEDA, K. Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice. **C R Biol.** 327(6):581-9; 2004.
- AKIYAMA, S.K.; NAGATA, K. & YAMADA, K.M. Cell surface receptors for extracellular matrix components. **Biochimica et Biophysica Acta** 1031: 91-110, 1990.
- ALBERTS, B. *et al.* *Biologia Molecular da Célula*, 3. ed. Porto Alegre: **Artes Médicas**, 1997.
- AMBROSI, M.; CAMERON, N.; DAVIS, B. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. **Org Biomol Chem.** 7;3(9):1593-608, 2005.
- ASIMAKOPOULOS, G. & TAYLOR, K. Effects of cardiopolmonary bypass on leukocytes and endothelial adhesion molecules. **Ann Thorac Surg** 66: 2135-44; 1998.
- ASKAR, A. Faba beans (*Vicia faba* L.) and their role in the human diet. **Food and Nutrition Bulletin**, Tokyo, v.8, n.3, p.15-24, 1986.
- BAGGIOLINI, M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature.* 9;392(6676):565-8, 1998.
- BAGGIOLINI, M. The enzymes of the granules of polymorphonuclear leukocytes and their functions. **Enzyme.** 3(1):132-60; 1972.

- BANGA, H.; WALKER, R.; WINBERRY, L.; RITTENHOUSE, S. Pertussis toxin can activate human platelets. Comparative effects of holotoxin and its ADP-ribosylating S1 subunit. **J Biol Chem.** 5;262(31):14871-4; 1987.
- BARONDES, S. Bifunctional properties of lectins: lectins redefined. **Trends Biochem Sci.** 13(12):480-2; 1988.
- BELLOCCHIO, S.; MORETTI, S.; PERRUCCIO, K.; FALLARINO, F.; BOZZA, S.; MONTAGNOLI, C.; MOSCI, P.; LIPFORD, G.; PITZURRA, L.; ROMANI, L. TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. **J Immunol.** 15;173(12):7406-15; 2004.
- BEN-BARUCH, A.; MICHIEL, D.F.; OPPENHEIM, J.J. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 11703-11706, 1995.
- BESEMER, J.; HUJBER, A.; KUHN, B. Specific binding, internalization, and degradation of human neutrophil activating factor by human polymorphonuclear leukocytes. **J Biol Chem.** 15;264(29):17409-15; 1989.
- BORREGAARD, N.; COWLAND, J. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood.** May 15;89(10):3503-21; 1997.
- BRUYNINCKX, W.; COMERFORD, K.; LAWRENCE, D.; COLGAN, S. Phosphoinositide 3-kinase modulation of beta(3)-integrin represents an endogenous "braking" mechanism during neutrophil transmatrix migration. **Blood.** 15;97(10):3251-8; 2001.
- BUCK, C. & HORWITZ A. Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. **Annual Review of Cell Biology** 3: 179-205, 1987.

- BUNN-MORENO, M.M.; CAMPOS-NETO, A. Lectins extracted from seeds of *Artocarpus integrifolia* (Jackfruit) potent and selective stimulator(s) of distinct human T and B cell functions. **J. Immunol.**, v. 127, p. 427, 1981.
- CASSATELA, M. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. **Immunology Today** **16**: 21-26, 1995.
- CLARK, E.; BRUGGE, J. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. **Science**. 14;268(5208):233-9; 1995.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, R.; COLLINS, T. Patologia estrutural e funcional, 6. ed. Rio de Janeiro: **GUANABARA KOOGAN S. A.**, 2000.
- CROCKETT-TORABI & FANTONE, JC. The selectins: insights into selectin-induced intracellular signaling in leukocytes. **Immunol Res.** 14(4):237-51, 1995.
- De ROBERTIS, E.M.F.; HIB, J. Bases da Biologia Celular e Molecular. **Guanabara Koogan**, 2001.
- DELGADO, M. Lectinas de *Artocarpus integrifolia* estimulam padrão diferente de citocinas. **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas, 1993.
- DESHPANDE, S.; DAMODARAN, S. Conformational characteristics of legume 7S globulins as revealed by circular dichroic, derivative u.v. absorption and fluorescence techniques. **Int J Pept Protein Res.** 35(1):25-34; 1990.
- DIAS-BARUFFI, M.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Isolation and partial chemical characterization of macrophage-derived-neutrophil-chemotactic-factor. **Mediators Inflammation**, v.4, p. 52-54, 1995a.
- DIAS-BARUFFI, M.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Biological characterization of an homogeneous fraction of purified

- macrophage-derived-neutrophil-chemotactic-factor. **Mediators Inflammation**, 4: 55-57, 1995b.
- DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82(1):47-95; 2002.
 - ERTEL, W.; KEEL, M.; NEIDHARDT, R.; STECKHOLZER, U.; KREMER, J. P.; UNGETHUEM, U. & TRENTZ, O. Inhibition of the defense system stimulating interleukin-12 interferon-gamma pathway during critical illness. **Blood** 89: 1612-20, 1997.
 - ETZLER, M.E.; BORREBAECK, C. Carbohydrate binding activity of a lectin-like glycoprotein from stems and leaves of *Dolichos biflorus*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.96, n.1, p.92-97, 1980.
 - ETZLER, M.E.; KABAT, E.A. Purification and characterization of a lectin (plant hemagglutinin) with blood group A specificity from *Dolichos biflorus*. **Biochemistry**, v.9, n.4, p.896-877, 1970.
 - FESSLER, M. B.; ARNDT, P.; FRASCH, S.; LIEBER, J.; JOHNSON, C.; MURPHY, R.; NICK, J.; BRATTON, D.; MALCOLM, K. & WORTHEN, G. Lipid rafts regulate lipopolysaccharide-induced activation of Cdc42 and inflammatory functions of the human neutrophil. **J Biol Chem** 279: 39989-98, 2004.
 - FEUK-LAGERSTEDT, E.; JORDAN, E. T.; LEFFLER, H.; DAHLGREN, C. & KARLSSON, A. Identification of CD66a and CD66b as the major galectin-3 receptor candidates in human neutrophils. **J Immunol** 163: 5592-8, 1999.
 - FOLKESSON, H.; MATTHAY, M.; HEBERT, C.; BROADDUS, V. Acid aspiration-induced lung injury in rabbits is mediated by interleukin-8-dependent mechanisms. **J Clin Invest.** 96(1):107-16; 1995.

- FORD-HUTCHINSON, A.; BRAY, M.; DOIG, M.; SHIPLEY, M.; SMITH, M. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. **Nature**. 17;286(5770):264-5; 1980.
- FORTE, W.C.N.; ALMEIDA, R.M.; BIZUTI, G.S.C.; FORTE, D.N.; BRUNO, S.; RUSSO-FILHO, R.S.; LIMA, C.A.C.. The phagocytosis by polymorphonuclear neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus. **Departamento de Clínica Médica do Hospital Central da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo**, São Paulo, 2002.
- FREEMAN, B.; CRAPO, J. Biology of disease: free radicals and tissue injury. **Lab Invest**. 47(5):412-26; 1982.
- FREUDENBERG, N.; PIOTRASCHKE, J.; GALANOS, C.; SORG, C.; ASKARYAR, F. A.; KLOSA, B.; USENER, H. U. & FREUDENBERG, M. A. The role of macrophages in the uptake of endotoxin by the mouse liver. **Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol** 61: 343-9, 1992.
- FRIGERI, L.; LIU, F. Surface expression of functional IgE binding protein, an endogenous lectin, on mast cells and macrophages. **J Immunol**. 1;148(3):861-7; 1992.
- FRIGERI, L.; ZUBERI, R.; LIU, F. Epsilon BP, a beta-galactoside-binding animal lectin, recognizes IgE receptor (Fc epsilon RI) and activates mast cells. **Biochemistry**. 3;32(30):7644-9; 1993.
- FRUMAN, D. & CANTLEY, L. Phosphoinositide 3-kinase in immunological systems. **Seminars in Immunology**. 14: 7-18; 2002.
- GABIUS, H.; ANDRE, S.; KALTNER, H.; SIEBERT, H. The sugar code: functional lectinomics. **Biochim Biophys Acta**. 19;1572(2-3):165-77; 2002.

- GABIUS, H.; SIEBERT, H.; ANDRE, S.; JIMENEZ-BARBERO, J.; RUDIGER, H. Chemical biology of the sugar code. **ChemBiochem**. 7;5(6):740-64; 2004.
- GALLIN, JI. Neutrophil specific granules: a fuse that ignites the inflammatory response. **Clin Res**. 32(3):320-8; 1984.
- GANIKO, L.; MARTINS, A.; ESPERAFICO, E.; ROQUE-BARREIRA, M.C. Neutrophil Haptotaxis Induced by the Lectin Km+. **Glycoconjugate J.**, n.15, p. 527-530, 1998.
- GANIKO, L.; MARTINS, A.; FREYMULLER, E.; MORTARA, R.; ROQUE-BARREIRA, M.C. Lectin KM+-induced neutrophil haptotaxis involves binding to laminin. **Biochim Biophys Acta**, n.1721, p.152-163, 2005.
- GIANCOTTI, FG. Complexity and specificity of integrin signaling. **Nature Cell Biology**, 2: E13-E14; 2000.
- GOODMAN, R.; STRIETER, R.; FREVERT, C.; CUMMINGS, C.; TEKAMP-OLSON, P.; KUNKEL, S.; WALZ, A.; MARTIN, T. Quantitative comparison of C-X-C chemokines produced by endotoxin-stimulated human alveolar macrophages. **Am J Physiol**. 275(1 Pt 1):L87-95, 1998.
- GROB, P.; DAVID, E.; WARREN, T.; DELEON, R.; FARINA, P.; HOMON, C. Characterization of a receptor for human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/interleukin-8. **J Biol Chem**. 15;265(14):8311-6; 1990.
- HAJTO, T.; HOSTANSKA, K.; FREI, K.; RORDORF, C.; GABIUS, H.J. Increased secretion of tumor necrosis factor α , interleukin 1 and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to β -galactoside-specific lectin from clinically applied msitletoe extract. **Cancer Res.**, 50(11):3322-3326, 1990.
- HALLIWELL, J.M. & GUTTERIDGE, B. Iron toxicity and oxygen radicals. **Baillieres Clin Haematol**. 2(2):195-256; 1989.

- HAYASHI, F.; MEANS, T.; LUSTER, A. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. **Blood**. 1;102(7):2660-9; 2003.
- HENDERSON, L.; CHAPPEL, J. NADPH oxidase of neutrophils. **Biochim Biophys Acta**. 15;1273(2):87-107, 1996.
- HERSKOWITZ, A.; MANGANO, D. – Inflammatory cascade. A final common pathway for perioperative injury? **Anesthesiology**,85:957-960; 1996.
- HOLMES, W.; LEE, J.; KUANG, W.; RICE, G.; WOOD, W. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. **Science**. 13;253(5025):1278-80; 1991.
- HOSTANKA, K.; HAJTO, T.; SPAGNOLI, G.C.; FISCHER, J.; LENTZEN, H.; HERRMANN, R. A plant lectin derived from viscum album induces cytokine gene expression and protein production in cultures of human peripheral blood mononuclear cells. **Nat.Immunol.**, 14(5-6):295-304, 1995.
- HOWARD, I., SAGE, H.J., HORTON, C.B. Communication: studies on the appearance and location of hemagglutinins from a common lentil during the life cycle of the plant. **Archive of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.149, n.1, p.323-326, 1972.
- HYNES, R. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. **Cell**, 69: 11-25; 1992.
- IOACHIM, E.; CHARCHANTI, A.; BRIASOULIS, E.; KARAVASILIS, V.; TSANOOU, H.; ARVANITIS, D.L.; AGNANTIS, N.J.; PAVLIDIS, N. Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, fibronectin, collagen type IV and laminin in breast cancer: their prognostic value and role in tumour invasion and progression. **European Journal of Cancer**, v. 38, p. 2362-2370; 2002.

- JANSEN, G.; TÖRKVIST, L.; LÖFGREN, O.; RAUD, J.; LUNDEBERG, T. Effects of calcitonin gene-related peptide on tissue survival, blood flow and neutrophil recruitment in experimental skin flaps. **Br J Plast Surg.** 1999 Jun;52(4):299-303.
- JEANNIN, P.; DELNESTE, Y.; GOSSET, P.; MOLET, S.; LASSALLE, P.; HAMID, Q.; TSICOPOULOS, A.; TONNEL, A. Histamine induces interleukin-8 secretion by endothelial cells. **Blood.** 1;84(7):2229-33, 1994.
- JOHNSON, A.; MORAN, N.; Selective release of histamine from rat mast cells by compound 48-80 and anitgen. **Am J Physiol.** 216(3):453-9; 1969.
- JUNG, U.; NORMAN, K.; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K.; BEAUDET, A.; LEY, K. Transit time of leukocytes rolling through venules controls cytokine-induced inflammatory cell recruitment in vivo. **J Clin Invest.** 15;102(8):1526-33; 1998.
- KARLSSON, A.; DAHLGREN, C. Assembly and activation of the neutrophil NADPH oxidase in granule membranes. **Antioxid Redox Signal.** 4(1):49-60; 2002.
- KASAMA, T.; MIWA, Y.; ISOZAKI, T.; ODAI, T.; ADACHI, M.; KUNKEL, S. Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. **Inflamm Allergy.** 4(3):273-9; 2005.
- KOBAYASHI, S.; VOYICH, J.; BURLAK, C.; DELEO, F. Neutrophils in the innate immune response. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz).** 53(6):505-17; 2005.
- KOSMEHL, H.; BERNDT, A.; STRASSBURGER, S.; BORSI, L.; ROUSSELLE, P.; MANDEL, U.; HYCKEL, P.; ZARDI, L.; KATENKAMP, D.

- Distribution of laminin and fibronectin isoforms in oral mucosa and oral squamous cell carcinoma. **Br. J. Cancer**. 81(6):1071-9; 1999.
- KUIJPERS, T. W., HOOGERWERF, M., VAN DER LAAN, L. J., NAGEL, G., VAN DER SCHOOT, C. E., GRUNERT, F. and ROOS, D. CD66 nonspecific cross-reacting antigens are involved in neutrophil adherence to cytokine-activated endothelial cells. **J. Cell Biol.** 118: 457-66, 1992.
 - KUIJPERS, T. W., VAN DER SCHOOT, C. E., HOOGERWERF, M. and ROOS, D. Cross-linking of the carcinoembryonic antigen-like glycoproteins CD66 and CD67 induces neutrophil aggregation. **J. Immunol.** 151: 4934-40, 1993.
 - KURITA, N.; OARADA, M.; ITO, E.; MIYAJI, M. Antifungal activity of human polymorphonuclear leucocytes against yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Med Mycol.** 37(4):261-7; 1999.
 - KURT-JONES, E.; MANDELL, L.; WHITNEY, C.; PADGETT, A.; GOSSELIN, K.; NEWBURGER, P.; FINBERG, R. Role of toll-like receptor 2 (TLR2) in neutrophil activation: GM-CSF enhances TLR2 expression and TLR2-mediated interleukin 8 responses in neutrophils. **Blood**. 1;100(5):1860-8; 2002.
 - KUWABARA, I.; LIU, F-T. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophil to laminin. **J. Immunol.**, v.156, n.10, p.3939-3944, 1996.
 - LAMPUGNANI, M.; DEJANA, E. Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles. **Curr Opin Cell Biol.** 9(5):674-82; 1997.
 - LANNES-VIEIRA J. *Trypanosoma cruzi*-elicited CD8+ T cell-mediated myocarditis: chemokine receptors and adhesion molecules as potential

therapeutic targets to control chronic inflammation? **Mem Inst Oswaldo Cruz**; 98: 299-304; 2003.

- LARSSON, J.; SERRANDER, L.; STENDAHL, O & LUNDQVIST-GUSTAFSSON, H. Involvement of the beta2-integrin CD18 in apoptosis signal transduction in human neutrophils. **Inflammation Research**, 49: 452- 459; 2000.
- LAUFFENBURGER, D.; HORWITZ, A. Cell migration: a physically integrated molecular process. **Cell**. 9;84(3):359-69; 1996.
- LEUNG, K.; PEARCE, F. A comparison of histamine secretion from peritoneal mast cells of the rat and hamster. **Br J Pharmacol**. 81(4):693-701; 1984.
- LI, Z; JIANG, H; XIE, W. Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. **Science**, 287: 1046-1049; 2000.
- LIENER, I.E. Phytohemagglutinins (phytolectins). *Annual Review Plant Physiology*, Palo Alto, v.27, p.291-319, 1976.
- LIENER, I.E. The nutritional significance of the plant lectins. *In: ORY, R.L. Antinutrients and natural toxicants in foods*. Westport: Food & Nutrition Press,. p.143-157; 1981.
- LILES, W.; LEDBETTER, J.; WALTERSDORPH, A.; KLEBANOFF, S. Cross-linking of CD18 primes human neutrophils for activation of the respiratory burst in response to specific stimuli: implications for adhesion-dependent physiological responses in neutrophils. **J Leukoc Biol**. 58(6):690-7; 1995.
- LIPOWSKY, R. Adhesion of Membranes via Anchored Stickers. **Neurosci Lett**. v. 3, p. 202-206, 1996.

- LIS, H.; SHARON, N. Lectins as molecules and as Tools. **Ann. Rev. Biochem.**, v.55, p.35-67, 1986.
- LIS, H.; SHARON, N. The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.42, p.541-574, 1973.
- LOCHTER, A.; BISSEL, M. Involvement of extracellular matrix constituents in breast cancer. **Cancer Biology**, v. 6, p. 165-173, 1995.
- LOTZ, S.; AGA, E.; WILDE, I.; VAN ZANDBERGEN, G.; HARTUNG, T.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2. **J Leukoc Biol.** 75(3):467-77; 2004.
- LOYOLA, W.; GAZIRI, D.; GAZIRI, L.; FELIPE, I. Concanavalin A enhances phagocytosis and killing of *Candida albicans* by mice peritoneal neutrophils and macrophages. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 12;33(3):201-8, 2002.
- LUDWING, A.; EHLERT, J.E.; FLAD, H.D.; BRANDT, E. Identification of distinct surface – expressed and intracellular CXC-chemokine receptor 2 glycoforms in neutrophils: N-glycosylation is essential for maintenance of receptor surface expression. **J. Immunol.**, v. 165, p. 1044-1052, 2000.
- MANNEL, D.N.; BECKER, H.; GUNDT, A.; KIST, A.; FRANZ, H. Induction of tumor necrosis factor expression by a lectin from *viscum album*. **Cancer Immunol. Immunother.**, 33(3):177-182, 1991.
- MARTINS, P. Expressão de Receptores de Superfície em Neutrófilos e Avaliação do Metabolismo Oxidativo em Neutrófilos e Monócitos de Pacientes Sépticos e sua Associação com Disfunção de Órgãos 2005. **Dissertação de mestrado**. Escola Paulista de Medicina.

- MATSUMOTO, M.; FU, YX.; MOLINA, H.; HUANG, G.; KIM, J.; THOMAS, D.; NAHM, M.; CHAPLIN, D. Distinct roles of lymphotoxin alpha and the type I tumor necrosis factor (TNF) receptor in the establishment of follicular dendritic cells from non-bone marrow-derived cells. **J Exp Med.** 15;186(12):1997-2004; 1997.
- MIRANDA-SANTOS, I.; DELGADO, M.; BONINI, P.; BUNN-MORENO, M.; CAMPOS-NETO, A. A crude extract of *Artocarpus integrifolia* contains two lectins with distinct biological activities. **Immunol Lett.** 31(1):65-71; 1992
- MIRANDA-SANTOS, I.; MENGEL JR, J.; BUNN-MORENO, M.M., CAMPOS-NETO, A. Activation of T and B cell by a crude extract of *Artocarpus integrifolia* is mediate by a lectin distinct from jacalin. **J. Immunol. Methods**, v. 140, p. 197-203, 1991.
- MOCKEL, B.; SCHWARZ, T.; ZINKE, H., ECK, J.; LANGER, M.; LENTZEN, H. Effects of mistletoe lectin I on human blood cell lines and peripheral blood cells. Cytotoxicity, apoptosis and induction of cytokines. **Arzneimittelforschung**, 47(10):1145-1151, 1997.
- MOREIRA, R.A.; AINOUS, I.L.; OLIVEIRA, J.T.A. & CAVADA, B.S. Plant lectins, chemical and biological aspects. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 86(II):211-218, 1991.
- MORENO, A.; PEREIRA-DA-SILVA, G.; OLIVER C.; JAMUR, M.; PANUNTO-CASTELO, A.; ROQUE-BARREIRA, MC. The macrophage-derived lectin, MNCF, activates neutrophil migration through a pertussis toxin-sensitive pathway. **J Histochem Cytochem.** 53(6):715-23; 2005.

- MORENO, A.N.; JAMUR M.C.; OLIVER, C.; ROQUE-BARREIRA M.C. Mast Cell Desgranulations Induced by Lectins: effect on neutrophil recruitment. **Int arch allergy immunol.** 132:221 – 230; 2003. Doi: 10.1159/000074303.
- MUELLER, E.; KOVARIK, J.; URESIN, Y.; PREISIG-FLUCKIGER, S.; HENSEL, S.; LUCKER, P.; HOLT, B. Optimizing the absorption of valsopodar, a P-glycoprotein modulator, Part I: Selecting an oral formulation and exploring its clinical pharmacokinetics/dynamics. **J Clin Pharmacol.** 37(11):1001-8; 1997.
- MURPHY, P.; TIFFANY, H. Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. **Science.** 13;253(5025):1280-3; 1991.
- NATHAN, C. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. **J Clin Invest.** 80(6):1550-60; 1987.
- NG-SIKORSKI, J.; LINDEN, L.; EIERMAN, D.; FRANZEN, L.; MOLONY, L.; ANDERSSON, T. Engagement of L-selectin impairs the actin polymerizing capacity of beta 2-integrins on neutrophils. **J Cell Sci.** 109 (Pt 9):2361-9; 1996.
- NICOLSON, G.; BLAUSTEIN, J.; ETZLER, M. Characterization of two plant lectins from *Ricinus communis* and their quantitative interaction with a murine lymphoma. **Biochemistry.** 1;13(1):196-204; 1974.
- NORGAUER J, KOWNATZKI E, SEIFERT R, AKTORIES K. Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates actin and enhances O₂- production and secretion but inhibits migration of activated human neutrophils. **J Clin Invest.** 82(4):1376-82; 1988.

- OFEK, I.; GOLDHAR, J.; KEISARI, Y.; SHARON, N. Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. **Annu Rev Microbiol.** 49:239-76, 1995.
- OFEK, I.; SHARON, N. Lectinophagocytosis: a molecular mechanism of recognition between cell surface sugars and lectins in the phagocytosis of bacteria. **Infect Immun.** 56(3):539-47; 1988.
- OMANN, G.; ALLEN, R.; BOKOCH, G.; AINTER, R.; TRAYNOR, A.; SKLAR, L. Signal transduction and cytoskeletal activation in the neutrophil. **Physiol Rev.** 67(1):285-322; 1987.
- OSBORN, L. – Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. **Cell**,62:3-6; 1990.
- OTTONELLO, L.; DAPINO, P.; AMELOTTI, M.; BARBERA, P.; ARDUINO, N.; BERTOLOTTO, M.; DALLEGRI, F. Activation of neutrophil respiratory burst by cytokines and chemoattractants. Regulatory role of extracellular matrix glycoproteins. **Inflamm Res.** 47(8):345-50, 1998.
- PANUNTO-CASTELO, A.; SOUZA, M.; ROQUE-BARREIRA, M.; SILVA, J. KM(+), a lectin from *Artocarpus integrifolia*, induces IL-12 p40 production by macrophages and switches from type 2 to type 1 cell-mediated immunity against *Leishmania major* antigens, resulting in BALB/c mice resistance to infection. **Glycobiology**, n. 11, p.1035-1042, 2001.
- PATEL, K.; MODUR, V.; ZIMMERMAN, G.; PRESCOTT, S.; MCINTYRE, T. The necrotic venom of the brown recluse spider induces dysregulated endothelial cell-dependent neutrophil activation. Differential induction of GM-CSF, IL-8, and E-selectin expression. **J Clin Invest.** 94(2):631-42, 1994.
- PATON, W.D. Compound 48/80: a potent histamine liberator. **Br J Pharmacol Chemother.** (3):499-508; 1951.

- PAULSON, J. Glycoproteins: what are the sugar chains for? **Trends Biochem Sci.** 14(7):272-6; 1989.
- PELLETIER, M.; LAVASTRE, V.; SAVOIE, A.; RATTHE, C.; SALLER, R.; HOSTANSKA, K.; GIRARD, D. Modulation of interleukin-15-induced human neutrophil responses by the plant lectin *Viscum album* agglutinin-I. **Clin Immunol.** 101(2):229-36; 2001.
- PEREIRA-DA-SILVA, G.; MORENO, A.; MARQUES, F.; OLIVER, C.; JAMUR, M.; PANUNTO-CASTELO, A.; ROQUE-BARREIRA, MC. Neutrophil activation induced by the lectin KM+ involves binding to CXCR2. **Biochim Biophys Acta.** 1760(1):86-94; 2006.
- PRYJMA, J.; MYTAR, B.; LOPPNOW, H.; ERNST, M.; FLAD, H-D. FcR+ and FcR- monocytes differentially secrete monokines during pokeweed mitogen-induced T-cell-monocyte interactions. **Immunol.**, 75(2):355-360, 1992.
- QUESENBERRY, P.; HABIBIAN, H.; DOONER, M.; MCAULIFFE, C.; LAMBERT, J.; COLVIN, G.; MILLER, C.; FRIMBERGER, A.; BECKER, P. Physical and physiological plasticity of hematopoietic stem cells. **Blood Cells Mol Dis.** 27(5):934-7; 2001.
- QUINN, J.M.; ETZLER, M.E. Isolation and characterization of a lectin from roots of *Dolichos biflorus*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 258, p. 535-544, 1987.
- RABINOVICH, G.; ARIEL, A.; HERSHKOVITZ, R.; HIRABAYASHI, J.; KASAI, K.; LIDER, O. Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by recombinant galectin-1. **Immunology.** 97: 100-106; 1999.

- RADEMACHER, T.; DWEK, R. The role of oligosaccharides in modifying protein function. **Ciba Found Symp.** 145:241-55; discussion 255-6; 1989.
- RAY, K.; CLAPP, P.; GOLDSMITH, P.; SPIEGEL, A. Identification of the sites of N-linked glycosylation on the human calcium receptor and assessment of their role in cell surface expression and signal transduction. **J Biol Chem.** 18;273(51):34558-67; Dec 1998.
- RIBEIRO, R.; FLORES, C.; CUNHA, F.; FERREIRA, S. IL-8 causes in vivo neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. **Immunology.** 73(4):472-7; 1991.
- RIBERAU-GAYTON, G.; DUMONT, S.; MULLER, C.; JUNG, M.L.; POINDRON, P.; ANTON, R. Mistletoe lectins I, II and III induce the production of cytokines by cultured human monocytes. **Cancer Lett.**, 109:33-38, 1996.
- RICHTER, M.; TRUDEL, I.; TALOR, E. Cells involved in the immune response. XXXVII. Antigen-specific suppressor cells, capable of secreting an antigen-specific suppressor factor, migrate from the thymus to the spleen following primary immunization. **Scand J Immunol.** 32(6):611-22; 1990.
- ROIT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Immunology.** Editora: Mosby, London, 1996.
- ROLLINS, B. Chemokines. **Blood.** 1;90(3):909-28; 1997.
- ROQUE-BARREIRA, M.C.; PRAZ, F.; HALBWACHS-MECARELLI, L.; GREENE, L.J.; CAMPOS-NETO, A. IgA-affinity and characterization of the lectin jacalin. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v.19, p.149-57, 1986.
- ROSA, J.C.; De OLIVEIRA, P.S.; GARRATT, R.; BELTRAMINI, L.; RESING, K.; ROQUEBARREIRA, M.C.; GREENE, L.J. KM+, a mannose-binding lectin from *Artocarpus integrifolia*: amino acid sequence, predicted tertiary structure,

- carbohydrate recognition, and analysis of the beta-prism fold. **Protein Sci.**, v.8, p.13-24, 1999.
- ROSSI, F.; DE TOGNI, P.; BELLAVITE, P.; DELLA BIANCA, V.; GRZESKOWIAK, M. Relationship between the binding of N-formylmethionylleucylphenylalanine and the respiratory response in human neutrophils. **Biochim Biophys Acta.** 29;758(2):168-75; 1983.
 - ROT, A. Binding Of Neutrophil Attractant/Activation Protein-1 (Interleukin 8) To Resident Dermal Cells. **Cytokine**, V.4, N.5, P.347-352, 1992b.
 - ROT, A. Endothelial Cell Binding Of Nap-1/IL-8: Role In Neutrophil Emigration. **Immunol Today**, V.13, N.8, P.291-294, 1992a.
 - RUDIGER, H.; GABIUS, H. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconj J.** 18(8):589-613; 2001.
 - SABROE, I.; PRINCE, L.; JONES, E.; HORSBURGH, M.; FOSTER, S.; VOGEL, S.; DOWER, S.; WHYTE, M. Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. **J Immunol.** 15;170(10):5268-75; May, 2003.
 - SANTOS-DE-OLIVEIRA, R.; DIAS-BARUFFI, M.; THOMAZ, S.M.; BELTRAMINI, L.M.; ROQUE-BARREIRA, M.C. A neutrophil migration-inducing lectin from *Artocarpus integrifolia*. **J. Immunol.**, v.153, n.4, p.1798-1807, 1994.
 - SCHAUER, R.; FISCHER, C.; LEE, H.; RUCH, B.; KELM, S. Sialic acids as regulators of molecular and cellular interaction. In: GABIUS, H.; NAGEL, G.; Lectins and glycoconjugates in oncology. New York: **Springer. Verlag**, p. 5-24; 1988.

- SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annu Rev Immunol** 23: 197-223, 2005.
- SEKIDO, N.; MUKAIDA, N.; HARADA, A.; NAKANISHI, I.; WATANABE, Y.; MATSUSHIMA, K. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8. **Nature**. 14;365(6447):654-7; 1993.
- SENGELOV, H. Secretory vesicles of human neutrophils. **Eur. J. Haematol**, 58:1-24, 1986.
- SENGELOV, H.; FOLLIN, P.; KJELDSEN, L.; LOLLIKE, K.; DAHLGREN, C. and BORREGAARD, N. Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils. **J Immunol**. 154:4157-4165, 1995.
- SHAPPELL, S.; TOMAN, C.; ANDERSON, D.; TAYLOR, A.; ENTMAN, M.; SMITH, C. Neutrophil adherence to isolated adult canine myocytes. Evidence for a CD18-dependent mechanism. **J Clin Invest**. 85(5):1497-506; 1990.
- SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Sci. Am.**, v. 268, n.1, p. 82-89, 1993.
- SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**. 14(11):53R-62R; 2004.
- SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, v. 246, p. 227-234, 1989.
- SHARON, N.; LIS, H. Lectins: cell-agglutinating and sugar-specific proteins. **Science**. 15;177(53):949-59; 1972.
- SHEN, T.; & GUAN, J. Differential regulation of cell migration and cell cycle progression by FAK complexes with Src, PI3K, Grb7 and GRb2 in focal contacts. **FEBS Letters**, 499: 176-181; 2001.

- SIMS, T. & DUSTIN, M. The immunological synapse: integrins take the stage. **Immunology Review**, 186: 100-117; 2002.
- SIRAGANIAN, P.; SIRAGANIAN, R. Basophil activation by concanavalin A: characteristics of the reaction. **J Immunol.** 112(6):2117-25; 1974.
- SIRAGANIAN, R.; SIRAGANIAN, P. Mechanism of action of concanavalin A on human basophils. **J Immunol.** 114(2 pt 2):886-93; 1975.
- SMITH, J. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. **J. Leukoc. Biol.**56:672-686, 1994.
- SNYDERMAN, R.; GOETZL, E. Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis. **Science.** 21;213(4510):830-7; 1981.
- SPIEGEL, A. Mutations in G proteins and G protein coupled receptors in endocrine disease. **J Clin Endocrinol Metab**;81:2434-42; 1996.
- SPIEGEL, A.; JONES, T.; SIMONDS, W.; WEINSTEIN, L. G Proteins. **Austin: RG Landes**, 1994.
- SPRINGER, T. Leucocyte adhesion to cells. **Scand J Immunol.** 32(3):211-6; 1990.
- SPRINGER, T. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm, **Cell.** v. 76,:p. 301-314, 1994.
- SRINIVASAN, N.; RUFINO, S. D.; PEPYS, M. B.; WOOD, S. P. & BLUNDELL, T. L. A superfamily of proteins with the lectin fold. **Chemtracts Biochem.Mol. Biol.** 6, 149–164, 1986.
- STOCKS, S.; KERR, M.; HASLETT, C.; DRANSFIELD, I. CD66-dependent neutrophil activation: a possible mechanism for vascular selectin-mediated regulation of neutrophil adhesion. **J Leukoc Biol.** 58(1):40-8; 1995.

- STRADER, C.; FONG, T.; TOTA, M.; UNDERWOOD, D.; DIXON, RA. Structure and function of G protein-coupled receptors. **Annu Rev Biochem.**63:101-32; 1994.
- SULLIVAN, N.; THALI, M.; FURMAN, C.; HO, D.; SODROSKI, J. Effect of amino acid changes in the V1/V2 region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 glycoprotein on subunit association, syncytium formation, and recognition by a neutralizing antibody. **J Virol.** 1993;67(6):3674-9
- SULLIVAN, T.; GREENE, W.; PARKER, C. Concanavalin A-induced histamine release from normal rat mast cells. **J Immunol.** 115(1):278-82, 1975.
- SUZAKI, E.; KOBAYASHI, H.; KODAMA, Y.; MASUJIMA, T.; TERAOKAWA, S. Video-rate dynamics of exocytotic events associated with phagocytosis in neutrophils. **Cell Motil Cytoskeleton.**;38(3):215-28; 1997.
- TAMURA, M.; NOGIMORI, K.; MURAI, S.; YAJIMA, M.; ITO, K.; KATADA, T.; UI, M.; ISHII, S. Subunit structure of islet-activating protein, pertussis toxin, in conformity with the A-B model. **Biochemistry.** 26;21(22):5516-22; 1982.
- TANAKA, Y.; ADAMS, D.H.; SHAW, S. Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. **Immunol. Today**, v.14, p.111-115, 1993.
- TAPPER, H.; GRINSTEIN, S. Fc receptor-triggered insertion of secretory granules into the plasma membrane of human neutrophils: selective retrieval during phagocytosis. **J Immunol.** 1;159(1):409-18; 1997.
- TEMELES, D.; MCGRATH, H.; KITTLER, E.; SHADDUCK, R.; KISTER, V.; CRITTENDEN, R.; TURNER, B.; QUESENBERRY, P.J. Cytokine expression from bone marrow derived macrophages. **Exp Hematol.** 21(2):388-93; 1993.

- TERR, A.I.; IMBODEN, J.; PARLOW, T.G.; STITES, D.P. Medical Immunology. 10 ed. MacGraw-Hill, Medicine, 814p. 2001.
- VAN DAMME, E.; PEUMANS, W.; PUSZTAI, A.; BARDOCZ, S. Handbook of plant lectins: properties and biomedical applications. **Ed. John Wiley & Sons**, 452, 1998.
- VAN EEDEN, S.; KLUT M.; WALKER, B.; HOGG, J. The use of flow cytometry to measure neutrophil function. **J Immunol Methods**. 17;232(1-2):23-43; 1999.
- WADDELL, T.; FIALKOW, L.; CHAN, C.; KISHIMOTO, T.; DOWNEY G. Potentiation of the oxidative burst of human neutrophils. A signaling role for L-selectin. **J Biol Chem**. 15;269(28):18485-91; 1994.
- WALLAYS, G. AND CEUPPENS, J.L. Human T lymphocyte activation by pokeweed mitogen induces production of TNF-alpha and GM-CSF and helper signaling by IL-1 and IL-6 results in IL-2 dependent T cell growth. **Eur. Cytokine Netw.**, 4(4):269-277, 1993.
- WALZ A.; BAGGIOLINI M. A novel cleavage product of beta-thromboglobulin formed in cultures of stimulated mononuclear cells activates human neutrophils. **Biochem Biophys Res Commun**. 31;159(3):969-75; 1989.
- WEISSMANN G.; SERHAN C.; KORCHAK H.; SMOLEN J. Neutrophils: release of mediators of inflammation with special reference to rheumatoid arthritis. **Ann N Y Acad Sci**. 389:11-24; 1982.

- WELSH K.; CRESSWELL P.; GOUJET C.; SANDERSON A. The cytotoxic effect on human lymphocytes of rabbit antisera to human Fc (IgG). **Transplantation**. 12(6):468-71; 1971.
- WESTERMANN J.; ENGELHARDT B. & HOFFMANN J. Migration of T cells in vivo: molecular mechanisms and clinical implications. **Ann Intern Med**; 135: 279-295; 2001.
- WILLIAMS MA & SOLOMKIN JS. Integrin-mediated signaling in human neutrophil functioning. **Journal of Leukocyte Biology**, 65: 725-736; 1999.
- WITKO-SARSAT, V.; RIEU, P.; DESCAMPS-LATSCHA, B.; LESAVRE, P. and HALBWACHS-MECARELLI, L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Lab Invest** 80: 617-53, 2000.
- WRIGHT S.; DETMERS P. Adhesion-promoting receptors on phagocytes. **J Cell Sci Suppl**. 9:99-120; 1988.
- WYCZOLKOWSKA J.; PROUVOST-DANON A.; MASLINSKI C. Activation of hamster mast cells for IgE-mediated histamine release. **Agents Actions**. 18(1-2):172-5; 1986.
- YAMADA, K.M. Fibronectin and other cell interactive glycoproteins. In: HAY, E.D. (ed.). **Cell biology of extracellular matrix**. 2 ed. New York, Plenum Press, cap.4, p.111-146; 1991.
- ZAFFRAN, Y.; LEPIDI, H.; BONGRAND, P.; MEGE, J.L.; CAPO, C. F-actin content and special distribution in resting and chemoattractant-stimulated human polymorphonuclear leucocytes. Which role for intracellular calcium? **J. Cell Sci.**, v. 105, p.675-84, 1993.



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos quinze dias do mês de agosto de 2007, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação **“PAPEL DA LECTINA VEGETAL KM+ NA ATIVAÇÃO E AUMENTO DA CAPACIDADE MICROBICIDA DE NEUTRÓFILOS HUMANOS”** apresentada por **CAROLINA SCHWARTZ** para obtenção do título de mestre; Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Profª. Drª. Andréa Novais Moreno PUCPR - Presidente	
Profª. Drª. Lia Sumie Nakao PUCPR	
Profª. Drª. Maria Cristina Roque Antunes Barreira FMRP/USP	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Profª. Drª. Andréa Novais Moreno

Conceito: A

Profª. Drª. Lia Sumie Nakao

Conceito: A

Profª. Drª. Maria Cristina Roque Antunes Barreira

Conceito: A

Conceito Final: A

Observações da Banca Examinadora:

Profª. Drª. Andréa Novais Moreno
Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho
Diretor do PPGCS PUCPR