

## AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES HEMAGLUTINANTES E DE INTERAÇÃO COM LINFÓCITOS T HUMANOS NAS FRAÇÕES PARCIALMENTE PURIFICADAS DA LECTINA DE MASSAS DE OVAS DE *BIOMPHALARIA GLABRATA* (VARIEDADE ALBINA).

\* Shirley Rosa UTIYAMA  
\*\* Maria Eugenia R. DUARTE  
\*\* José Hazencleve DUARTE  
\*\*\* Paulo Roberto WUNDER

RIALA6/790

UTIYAMA, S.R. et alii - Avaliação das atividades hemaglutinantes e de interação com linfócitos T humanos nas frações parcialmente purificadas da lectina de massas de ovas de *Biomphalaria glabrata* (variedade albina). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56(1):1-12, 1996.

RESUMO: O extrato bruto de massas de ovas (MO) de *Biomphalaria glabrata* (variedade albina), após precipitação fracionada com sulfato de amônia, forneceu uma fração protéica de 30-70% de saturação, que além da atividade lectínica hemaglutinante, também foi capaz de interagir com linfócitos T humanos. Tal fração foi submetida à cromatografia em coluna de DEAE Sephadex A-50-120, e três frações com atividades biológicas distintas foram obtidas: F-I) fração hemaglutinante; F-III) fração de interação com linfócitos, e FIL) contendo as duas atividades. A fração de interação com linfócitos (FIL) se mostrou um potente bloqueador da formação de rosáceas espontâneas entre linfócitos T e eritrócitos de carneiro. Essa inibição não foi afetada por íons  $Ca^{++}$  e  $Mg^{++}$  e não foi revertida na presença dos inibidores preferenciais de hemaglutinação (ceto-hexoses) ou de outros açúcares. Além disso, o fenômeno de rosáceas não foi inibido quando os eritrócitos foram previamente incubados com FIL.

Ensaio de imunofluorescência indireta e citometria de fluxo demonstraram que FIL bloqueou a ligação do anticorpo monoclonal anti-CD<sub>2</sub> com o receptor de membrana de linfócitos T, reforçando os dados preliminares obtidos com a inibição de rosáceas.

DESCRIPTORIOS: Lectina, Moluscos, Linfócitos, *Biomphalaria glabrata*.

### INTRODUÇÃO

As lectinas são macromoléculas de natureza protéica, de origem não imune e que se ligam não covalentemente a carboidratos com configuração apropriada<sup>2,8</sup>. Dessa interação resultam propriedades químicas e biológicas diversas tais como, hemaglutinação, efeito mitogênico, aglutinação de células tumorais, entre outras, que têm conferido às lectinas uma aplicabilidade crescente, tanto na identificação de marcadores de superfície celular quanto na purificação de oligossacarídeos e glicoconjugados de membrana<sup>11,12,20,21</sup>.

Embora as lectinas de plantas sejam as mais estudadas, elas não são privativas desse gênero. Nos gastrópodos, por exemplo, as lectinas são encontradas principalmente na hemolinfa, glândula de albúmen e nas massas de ovas<sup>5,16,19</sup>. Os moluscos do gênero *Biomphalaria*, da família *Planorbidae*, hospedeiros intermediários do trematoda *Schistosoma mansoni*, foram estudados pela primeira vez em 1973, por SAMPAIO et alii<sup>19</sup>. Esses autores caracterizaram na glândula de albúmen de *B. glabrata* e *B. straminea* a presença de uma lectina com propriedade hemaglutinante para eritrócitos humanos dos grupos A e B.

\* Departamento de Patologia Médica - Laboratório de Imunopatologia - UFPr

\*\* Departamento de Bioquímica - UFPr

\*\*\* Departamento de Patologia Médica - Disciplina de Imunologia Clínica - UFPr

Posteriormente, STANISLAWSKI et alii, MICHELSON & DUBOIS<sup>16</sup> e BRETTING et alii<sup>3</sup>, também demonstraram a propriedade hemaglutinante dessa lectina, empregando diferentes métodos de purificação por cromatografia.

Ensaio preliminares realizados em nosso laboratório mostraram que além da propriedade hemaglutinante anteriormente caracterizada, uma fração protéica da massa de ovas (M.O.) de *B. glabrata* (variedade albina) apresentava atividade de interação com linfócitos T humanos<sup>23</sup>. Tal atividade não foi revertida em presença de diferentes açúcares testados, impossibilitando, por enquanto, denominar-se esta fração de lectina, que passa a ser designada como fração de interação com linfócitos (FIL).

Como não foi encontrada na literatura nenhuma investigação relativa à interação de proteínas de M.O. de *B. glabrata* com linfócitos T humanos, o presente trabalho tem por objetivo um estudo mais detalhado das atividades biológicas destas proteínas, bem como procura separar e preservar as atividades hemaglutinantes e de interação com linfócitos pelo uso de cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-50-120.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Obtenção das massas de ovas*

Os moluscos do gênero *B. glabrata* (variedade albina) foram cedidos pela Universidade Estadual de Londrina-Pr. Os mesmos foram mantidos em aquários apropriados com água aerada e iluminação constante. As massas de ovas (M.O.) foram coletadas diariamente da superfície de placas de isopor e conservadas em solução de NaCl 0,9% em freezer a -20°C.

### *Purificação da lectina*

O processo de extração das lectinas de M.O. dos moluscos *B. glabrata* foi realizado por trituração das M.O. em aparelho de Von Potter Elvehjem, à temperatura de 0-4°C, utilizando NaCl 0,9% (Merck) como extrator. Após centrifugação a 10.000xg, por 20 minutos a 4°C (centrífuga refrigerada Sorvall Inc. RC2-B), o resíduo foi reextraído e o sobrenadante de cada extração reunido e considerado como sendo o extrato bruto (E.B.). Após a precipitação fracionada com sulfato de amônia, nas saturações de 0-30%, 30-70% e 70-90%, os precipitados foram solubilizados em NaCl 0,9% e exaustivamente dializados contra esta mesma solução, até apresentarem teste negativo com reagente de Nessler. A fração obtida da saturação de 30-70% com sulfato de amônia foi submetida à cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-50-120 (Sigma), previamente tratada com solução de NaCl 0,9% que também serviu como eluente. O fluxo de escoamento foi de 20ml/hora (coletor LKB-7000

Ultrarac). As frações eluídas foram avaliadas quanto ao teor de proteínas, açúcar, atividade hemaglutinante e interação com linfócitos.

As concentrações de proteína foram determinadas pelo método de LOWRY et alii<sup>13</sup>, enquanto as de carboidratos foram determinadas pelo método fenol ácido sulfúrico, conforme descrito por DUBOIS et alii<sup>6</sup>.

### *Ensaio de hemaglutinação com eritrócitos humanos*

A atividade hemaglutinante foi avaliada em cada etapa do processo de purificação. A 100µl de cada fração, adicionava-se 100µl de solução de NaCl 0,9% e 20µl de suspensão de eritrócitos humanos a 2% (grupos A,B, AB e O separadamente). As leituras foram realizadas 6-12 horas após o início da reação.

O efeito de cátions divalentes (Ca<sup>++</sup> e Mg<sup>++</sup>) e da atividade inibidora de açúcares foi testado de forma similar, substituindo-se, nos sistemas, a solução de NaCl 0,9% por solução, contendo os cátions (10mM), ou açúcares inibidores (100µmoles/ml) respectivamente.

### *Separação de linfócitos do sangue periférico*

Sangue de doadores sadios foi coletado em presença de heparina livre de preservativos (Liquemine-Roche). As células mononucleares foram obtidas por centrifugação a 200xg por 30 minutos em gradiente de Ficoll Hypaque (Histopaque-1077, Sigma). As células foram lavadas duas vezes em NaCl 0,9% e uma vez em meio RPMI-1640 (Sigma). A concentração celular adequada para cada protocolo foi ajustada em meio RPMI-1640 suplementado com 2mM de glutamina (Sigma), 22mM de Hepes (Sigma), 30µg/ml de ampicilina (Cibran) e 2,0g/l de bicarbonato de sódio (Merck), doravante denominado de meio completo.

### *Efeito da proteína de M.O. de B.glabrata sobre a formação de rosáceas espontâneas entre linfócitos T e eritrócitos de carneiro (E)*

Linfócitos humanos na concentração de 6 x 10<sup>6</sup> células/ml de meio completo, num volume de 100µl, foram misturados com 100µl de cada fração obtida das M.O. de *B.glabrata* e 100µl de meio completo. O sistema foi incubado a 25°C durante 5 horas. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de exclusão do azul de Tripán (Merck), a qual sempre se mostrou superior a 95%. Na seqüência, 100µl dessa solução foram colocados em presença de 100µl de E a 0,5%.

A mistura foi submetida à centrifugação a 150xg por 5 minutos à temperatura ambiente e incubada por 60 minutos a 4°C em banho de gelo. Após incubação, o sedimento de células foi ressuspenso delicadamente e a contagem de linfócitos foi efetuada em câmara de Neubauer. O resultado foi expresso na forma de média das porcentagens de células formadoras de rosáceas E, obtidas a partir das contagens de experi-

mentos em duplicatas feitas em microscópio ótico comum (Olympus CBA).

Linfócitos não tratados com as frações protéicas de M.O. de *B.glabrata* foram utilizados como controles normais da formação de rosáceas E.

Com a finalidade de se determinar a temperatura ideal de reação entre a FIL e os linfócitos, foram realizados experimentos semelhantes de rosáceas-E, nos quais se estabeleceu uma curva com as seguintes temperaturas de incubação: 4°, 15°, 25°, 30° e 37°C.

Com relação ao tempo necessário para a interação da proteína de M.O. de *B.glabrata* (FIL) com linfócitos, foram preparados experimentos em que o sistema foi incubado por 1, 3, 5, 7, 16 e 24 horas, respectivamente, prosseguindo-se conforme descrito anteriormente.

Nos ensaios com açúcares inibidores, procedeu-se conforme o protocolo inicial, substituindo-se os 100µl de meio completo por 100µl da solução de açúcar (10 µmoles). Os seguintes açúcares foram utilizados: D-frutose, D-galactose, D-mannose, L-fucose, L-sorbose, L-rhamnose, α-metil-D-glucosídeo, β-metil-D-galactosídeo, myo inositol, metil frutofuranosídeo, ácido N-acetil neuramínico, ácido láctico, e N-acetil-D-glucosamina.

#### *Reação de Imunofluorescência Indireta (IFI)*

Células mononucleares na concentração de  $5 \times 10^5$  células/100µl de meio completo foram pré-incubadas com 100µl de FIL por 5 horas a 25°C. A seguir, as células foram lavadas em meio completo e incubadas com 25µl de anticorpo monoclonal anti-CD2 (Becton Dickinson) por 30 minutos a 4°C. Após nova lavagem, as células foram incubadas com 100µl de soro de cabra anticamundongo conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC-Sigma, USA), por 30 minutos a 4°C. Após duas lavagens, as células foram res-suspensas e examinadas em microscópio de fluorescência (Epi-iluminação, lâmpada de halogênio, Carl Zeiss, Germany). Trezentas células foram contadas e a porcentagem de células fluorescentes foi determinada. Como controle foram utilizadas células não tratadas com FIL, e incubadas com anticorpo monoclonal anti-CD2.

#### *Citometria de Fluxo*

Os testes de imonofluorescência foram repetidos em um aparelho FacScan (Becton-Dickinson, USA). A fluorescência produzida pelo FITC foi excitada por meios de luz de argônio a 488nm. Os dados foram coletados em um computador Hewlett Packard 9153C

acoplado ao FacScan. Somente as células separadas na janela para linfócitos foram analisadas, e 10.000 células medidas em cada análise.

O aparelho foi calibrado por meio de partículas de látex conjugadas ao FITC (pérolas calibradas de 4:8µm-Becton Dickinson, USA). A preparação de linfócitos na concentração de  $1 \times 10^6$  células/ml foi incubada com diferentes concentrações de FIL (tubos 2,3 e 4) por 5 horas a 25°C. Após uma lavagem as células foram incubadas com 200µl do anticorpo monoclonal anti-CD2 (tubos 2,3 e 4). Em paralelo, uma parte das células, sem a FIL, foi incubada com o controle isotípico (tubo 5) marcado com fluoresceína (4°C, 30 minutos). Após duas lavagens, as células foram ressuspensas em meio completo e analisadas no FacScan. No controle negativo, os linfócitos não receberam o anticorpo-CD2, nem o controle isotípico. O controle positivo foi obtido pela incubação de linfócitos com anticorpo anti-CD2 (tubo 1).

## RESULTADOS

### *Purificação parcial da lectina de M.O. de B.glabrata*

A Tabela 1 mostra as etapas de purificação da lectina de *B.glabrata* com sulfato de amônia.

Após a precipitação fracionada com sulfato de amônia, a fração 30-70% permitiu recuperar 25% das proteínas em relação ao E.B., apresentando uma relação proteína total/açúcar total de 3,15. Esta fração, por apresentar melhor atividade de interação com linfócitos, foi selecionada para purificação em coluna de DEAE-Sephadex e tal tratamento possibilitou recuperar 3,4% de proteínas nas frações I, II e III. As demais frações (F-70-90% e F-90-100%) apresentavam menor atividade para hemáceas e linfócitos, e por isso não foram investigadas.

### *Separação das atividades hemaglutinantes e de interação com linfócitos*

A cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-50-120 da fração de saturação 30-70% com sulfato de amônia permitiu separar e preservar as atividades hemaglutinantes e de interação com linfócitos (FIL). Os resultados relativos à concentração de proteína e açúcar total das frações recuperadas da coluna de DEAE-Sephadex, bem como a atividade biológica da lectina estão representadas na Figura I.

Foram obtidas três frações com as seguintes atividades: F-I) ativa apenas para hemácias do sistema ABO humano; F-III) ativa apenas para linfócitos humanos (FIL); F-II) com atividade para ambas as células.

TABELA 1

PURIFICAÇÃO DA LECTINA DE M. O. DE *B. GLABRATA* (VAR. ALBINA). FRACIONAMENTO COM SULFATO DE AMÔNIA E PURIFICAÇÃO PARCIAL DA FRAÇÃO 30-70%\* EM COLUNA DE DEAE-SEPHADEX A-50-120.

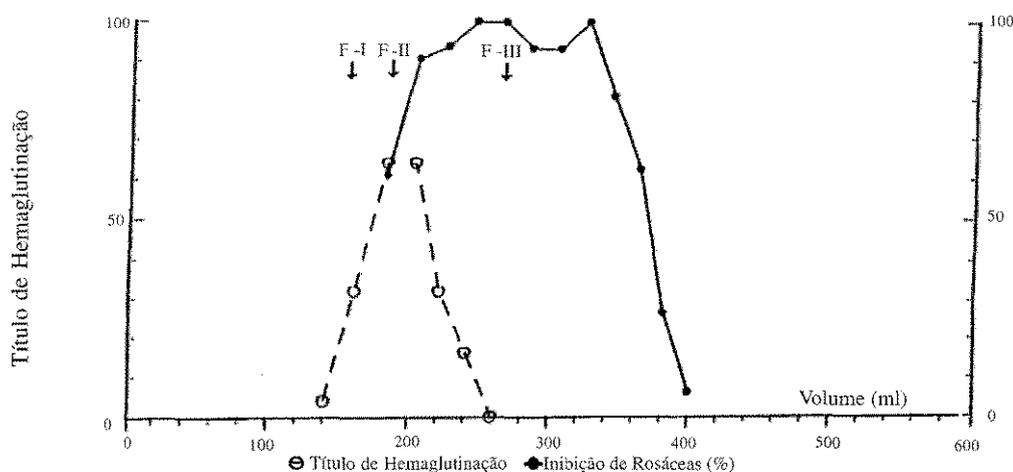
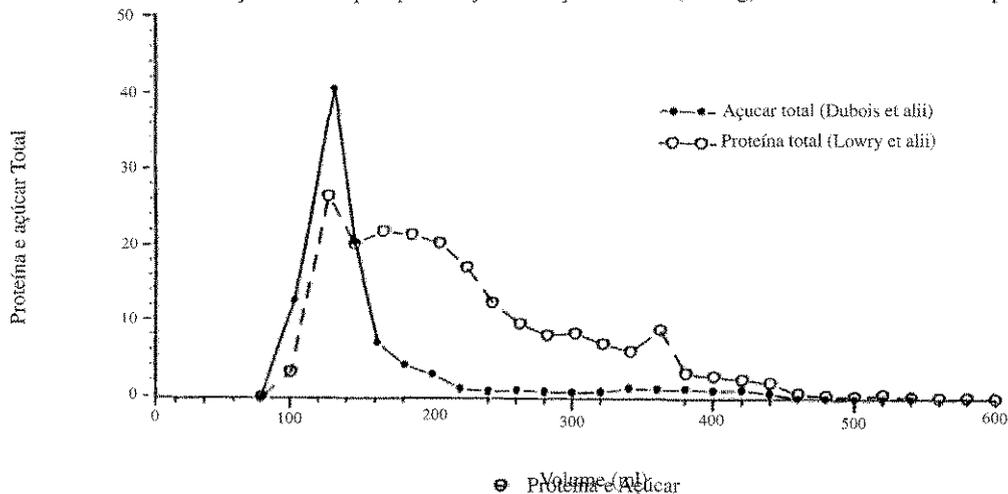
FRAÇÕES	VOL. (ml)	PROT. TOTAL (mg)	AÇÚCAR TOTAL (mg)	PROT. TOTAL AÇÚCAR TOTAL	RENDIMENTO <sup>a</sup> (%)	PROTEÍNA <sup>b</sup> µg
EB	650	5044	11739	0,43	100	33,9
F-30-70%	135	1250	397	3,15	25	77,0
F-70-90%	108	850	495	1,72	17	131,0
F-90-100%	50	467	282	1,66	9	155,0
*F-I	40	42,7	28,07	1,52	0,84	-
*F-II	60	59,9	8,44	7,09	1,19	-
*F-III	220	67,1	11,03	6,08	1,33	6,3

<sup>a</sup> - Rendimento em relação ao extrato bruto (EB).

<sup>b</sup> - Concentração mínima de proteína com atividade inibitória para rosáceas-E.

\* - Fração 30-70% contendo 202mg de proteína total (Lowry et alii).

\* - F-I, F-II e F-III = Frações obtidas pela purificação da fração 30-70% (202mg) em coluna de DEAE - Sephadex.



F-I) Fração ativa para hemácias (eluída entre 140 e 180 ml)

F-II) Fração com atividade mista (eluída entre 180 e 260 ml)

F-III) Fração ativa com linfócitos (eluída entre 260 e 440 ml)

\* Coluna utilizada: 40/3,5cm; eluente: NaCl 0,9%; fluxo de escoamento: 20 ml/hora.

Fração aplicada: F-30-70% (12,5 ml - 202,4 mg de proteínas)

*Propriedade hamaglutinante da lectina de B. glabrata*

Os ensaios de hemaglutinação permitiram reafirmar para o molusco de *B. glabrata* (variedade albina), a ausência de atividade com hemácias humanas do grupo "O" e atividade acentuada com hemácias dos grupos "A" e "AB" (Figura II). A adição de cátions divalentes Ca<sup>++</sup> e Mg<sup>++</sup> duplica a atividade hemaglutinante máxima sobre hemácias humanas dos grupos A, B, e AB. Após a purificação em DEAE-Sephadex, foi possível observar atividade hema-

glutinante até a concentração mínima de 1,61µg de proteína/100µl, o que representou uma purificação para F-I de 3,6 vezes em relação à F-30-70%, que apresentava atividade até a concentração mínima de 5,75µg/100µl (dados não demonstrados).

Investigando-se o efeito de açúcares inibidores sobre a reação de hemaglutinação, verificou-se serem as cetohexoses, D-frutose, D-mannose, e L-fucose os inibidores preferenciais da reação (2,5 a 10µmoles), conforme observa-se na Tabela 2.

TABELA 2

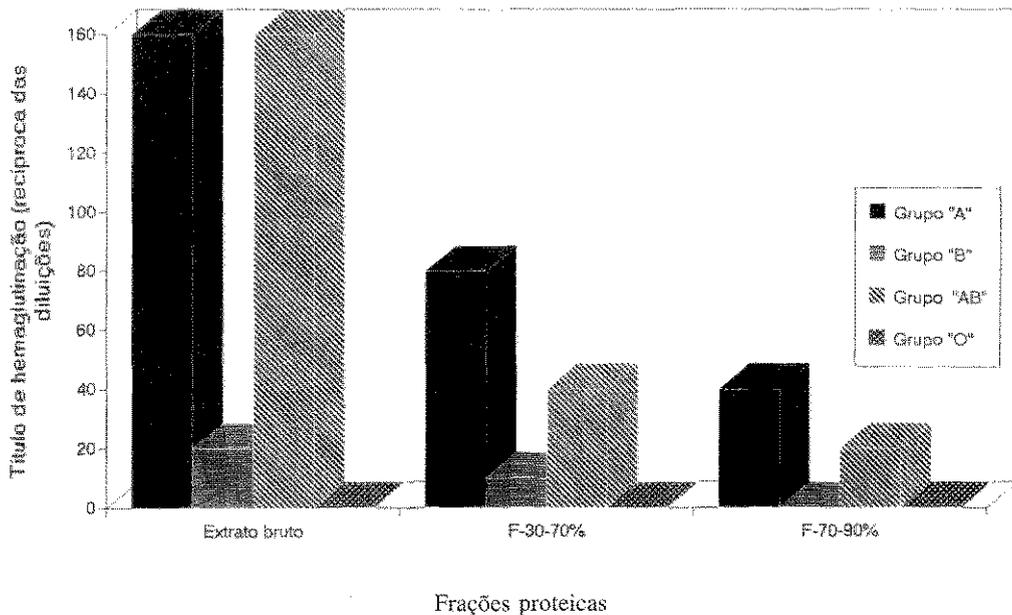
Açúcares inibidores da reação de hemaglutinação da lectina de M.O. de *B. Glabrata* (Var. Albina).

INIBIDORES	CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA (µmoles)		
	GRUPO "A"	GRUPO "B"	GRUPO "AB"
D-frutose	2,5	2,5	2,5
D-mannose	6,6	2,5	2,5
Metil fruto-furanosídeo	5,0	5,0	5,0
L-sorbose	13,3	13,3	13,3
Myo inositol	16,6	13,3	13,3
N-acetil-D-glucosamina	10,0	10,0	10,0
L-fucose	8,3	6,6	6,6

Os valores obtidos representam a média de 3 experimentos para cada grupo sanguíneo.

FIGURA II

Reação de hemaglutinação da lectina de M.O. de *B. glabrata* com eritrócitos do sistema ABO humano



Os títulos obtidos representam a média de 3 experimentos com sangues diferentes para cada grupo sanguíneo. \* F-30-70% e F-70-90% = frações semipurificadas com sulfato de amônia.

*Efeito da FIL sobre a formação de rosáceas -E(RE)*

Na Tabela 3 estão demonstrados os resultados de 10 experimentos de formação de RE. Os controles normais apresentaram uma média de 59,7% de células formadoras de RE, enquanto nos ensaios realizados em presença de FIL, a média foi de 1,7%, representando 97,1% de inibição de formação de RE. Nos sistemas em que as células foram lavadas duas vezes com meio completo, previamente à adição de eritrócitos de carneiro, os valores de inibição de RE (99%) foram tão

elevados quanto aqueles com células não lavadas (97,1%). Em cada etapa da purificação da FIL foram realizadas titulações com a finalidade de se detectar a diluição máxima de proteína capaz de inibir a formação de RE (Figura III e Tabela 1). Observou-se que a fração de interação com linfócitos, na concentração mínima de 6,3µg de proteína (diluição 1:64) ainda produzia um alto índice de inibição de RE, o que representava uma purificação de 5,38 vezes em relação ao E.B. que necessitava de uma concentração mínima de 33,9µg de proteínas (diluição 1:4) para produzir inibição de RE.

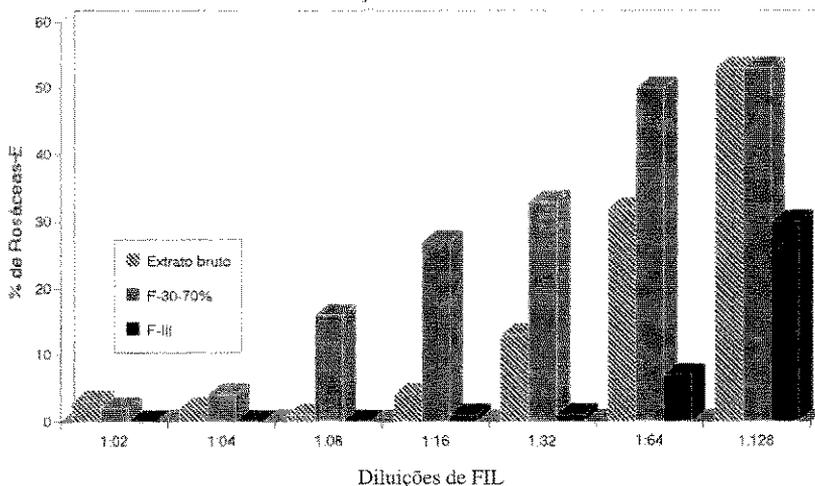
TABELA 3  
Efeito da proteína de M.O. de *B. glabrata* sobre a formação de Rosáceas-E

EXPERIMENTO	% DE ROSÁCEAS - E (5h, 25°C)			
	CONTROLE	LINF. + E.B. (SEM LAVAR)	LINF. + E.B. (LAVADO)	VIABILIDADE CELULAR
1	50	0 (100)	0 (100)	98
2	59	0 (100)	0 (100)	100
3	61	2 (97)	ND	97
4	61	0 (100)	0 (100)	99
5	61	3 (95)	2 (97)	97
6	64	0 (100)	ND	100
7	60	3 (95)	1 (98)	98
8	56	4 (93)	ND	98
9	59	2 (96)	ND	96
10	66	2 (95)	ND	95
$\bar{X}$	59,7 ± 4,14	1,7 (97,1) ± 1,48	0,6 (99) ± 0,89	97,8 ± 1,53

$\bar{X}$  - Representa a média de 10 experimentos com sangues de diferentes doadores.  
Os valores entre parênteses representam % de inibição de formação de Rosáceas-E.  
E.B. - Extrato bruto de M.O. de *B. glabrata*.  
ND - Não determinado.

FIGURA III

Caracterização da diluição máxima da proteína de M.O. de *B. glabrata* com efeito inibitório sobre a formação de rosáceas-E



Concentração mínima de FIL com atividade inibitória para rosáceas-E: EB=33,9 µg de prot.(dil. 1:16); F-30%=77µg de prot.(dil. 1:4); F-III=6,3µg de prot.(dil. 1:64). \*Controle sem FIL=60% de rosáceas-E.

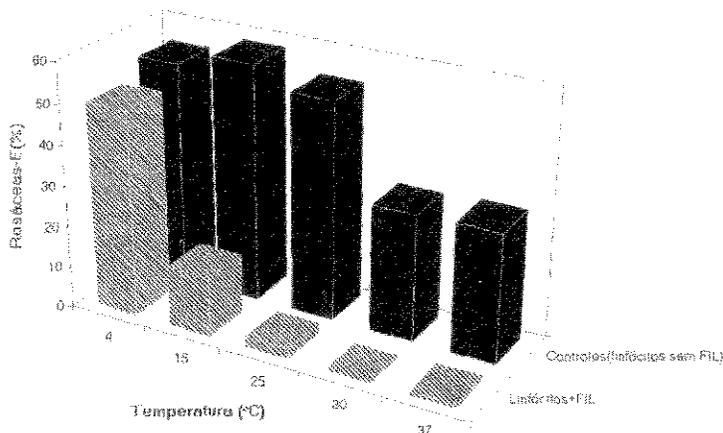
Experimentos paralelos demonstraram que FIL não se liga aos eritrócitos de carneiro, quando previamente incubada com estes, uma vez que a porcentagem de células formadoras de rosáceas foi semelhante àquela observada nos controles sem a proteína.

*Efeito da temperatura sobre a inibição de RE*

A figura IV demonstra que a temperatura ideal para que a FIL iniba a formação de RE é de 25°C. Nessa temperatura foi possível obter uma média de 2,6% de

FIGURA IV

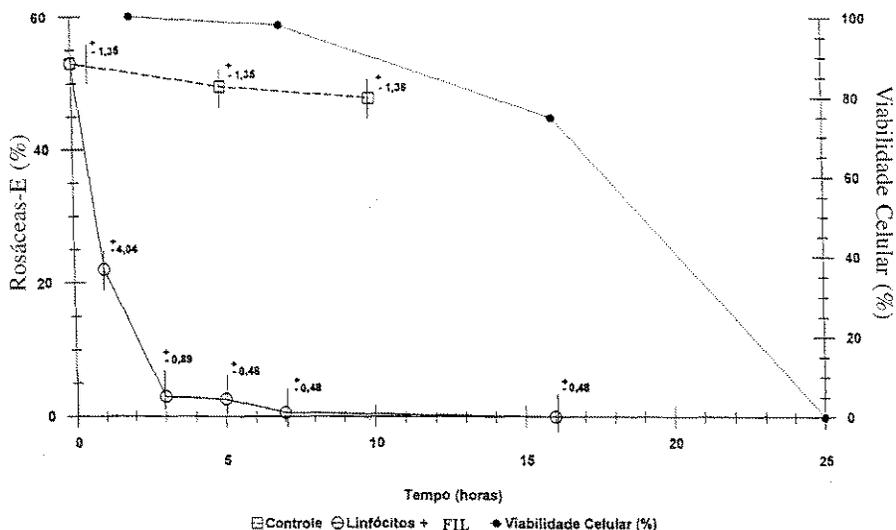
Efeito da temperatura de incubação sobre a interação de proteína de M.O. de *B. glabrata* (FIL) e linfócitos humanos.



Todos os valores representam a média de 5 experimentos com sangues diferentes. \*Tempo de incubação entre linfócitos e FIL = 5 horas.

FIGURA V

Efeito do tempo de incubação sobre a interação de proteína de M.O. de *B. glabrata* (FIL) e linfócitos humanos.



Todos os valores representam a média de 5 experimentos com sangues diferentes. Temperatura de incubação = 25°C.

RE após incubação dos linfócitos com a proteína por 5 horas, o que representou 95,1% de inibição na formação de RE, sem no entanto se verificar alteração importante nos controles sem a FIL.

Em temperaturas mais elevadas (30 e 37°C), embora a porcentagem de inibição de formação de RE seja maior (100 e 97,4% respectivamente), os controles forneceram resultados discrepantes.

*Efeito do tempo de incubação sobre a capacidade de inibidora de RE da FIL de B. GLABRATA*

A influência do tempo de incubação sobre a interação da FIL com linfócitos humanos pode ser verificada na Figura V. Esses resultados demonstram que entre 3 e 7 horas de incubação, tem-se os melhores percentuais de inibição de RE (3% e 0,6% de RE;

Tabela 4

Efeito de açúcares na interação entre proteínas de M.O. de *B. glabrata* (FIL) e linfócitos T humanos

Inibidores (10 µmoles)	% de Rosáceas-E (5h, 25°C)		Viabilidade Celular (%)
Metil frutofuranosídeo	4	(7)	100
D-frutose	1	(1,7)	98
D-galactose	0	(0)	98
D-mannose	0	(0)	98
L-sorbose	0	(0)	99
Myo inositol	4	(7)	99
B-metil D-galactosídeo	2	(3,5)	98
L-rhamnose	0	(0)	96
N-acetil D-glucosamina	4	(7)	97
D-glucosamina	4	(7)	97
a-metil D-glucosídeo	1	(1,7)	97
Glicuronato de sódio	1	(1,7)	90
Ác. N-acetil neuramínico	3	(5)	96
L-fucose	3	(5)	95
Ác. láctico	3	(5)	95

Os valores entre parênteses representam a % de inibição da atividade da proteína. Controle da reação sem **FIL** = 57% de Rosáceas-E. Controle com **FIL** (sem açúcar) = 0% de Rosáceas-E.

Tabela 5

Incubação prévia dos linfócitos humanos com a proteína de M.O. de *B. glabrata*: inibição da reação com anticorpo monoclonal

Experimento	% de Rosáceas-E		% de Linfócitos Fluorescentes	
	Controle (sem <b>FIL</b> )	Linfócitos + <b>FIL</b>	Linfócitos + Ác. Monocl.	Linfócitos + <b>FIL</b> + Ác. Monocl.
1	50	3 (94) <sup>a</sup>	56	6 (89) <sup>b</sup>
2	57	2 (96)	49	7 (86)
3	54	3 (94)	52	7 (86)
X	53,6 ±2,86	2,6 (95) ±0,47	52,3 ±2,86	6,6 (87) ±0,47

<sup>a</sup> - Os valores entre parênteses representam a % de inibição de formação de Rosáceas - E.

<sup>b</sup> - Os valores entre parênteses representam a % de inibição da ligação do anticorpo monoclonal.

controle: 53% e 49% de RE, respectivamente). Assim sendo, o tempo de 5 horas foi escolhido como sendo o ideal, tanto no aspecto de inibição de RE (2,6% RE), quanto para a viabilidade celular (98%), que se mostrou prejudicada somente após 16 horas de incubação.

#### *Efeito dos açúcares inibidores na interação proteína-linfócito*

As atividades biológicas das lectinas normalmente são revertidas pelo uso de inibidores específicos.

Na Tabela 4 estão representados os experimentos que demonstram os ensaios com açúcares inibidores. Verificou-se que nem mesmo aqueles açúcares que se mostraram fortes inibidores da atividade hemaglutinante (D-frutose, D-mannose, L-fucose) exerceram efeito na interação da proteína de M.O. de *B. glabrata* com linfócitos. A presença dos açúcares não alterou a viabilidade celular.

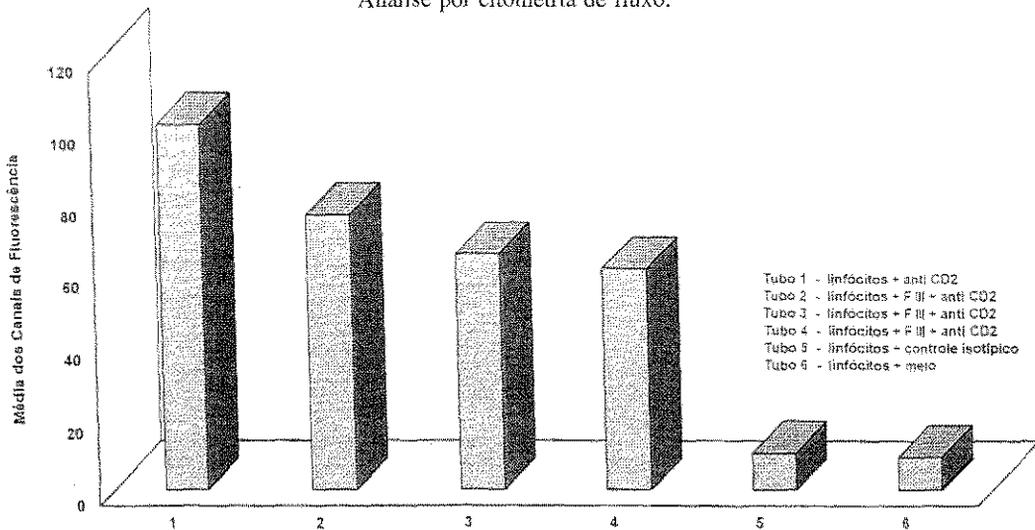
#### *Possível interação da FIL com o receptor CD2 de membrana de linfócitos T humanos*

Na tentativa de esclarecer se a inibição de RE pela FIL era devido à interação com o receptor CD2 na membrana de linfócitos T, foram realizados ensaios utilizando anticorpo monoclonal anti-CD2 marcado com isotiocianato de fluoresceína.

Os resultados da Tabela 5 mostram inicialmente um grupo de 3 experimentos de rosáceas, onde se observa que 56,6% dos linfócitos formaram RE, enquanto que linfócitos previamente incubados com a FIL não foram capazes de formar rosáceas (média=2,6%), demonstrando forte inibição de 95% causada pela presença da FIL. Experimentos em paralelo com anticorpo anti-CD2 fluorescente, mostraram que após incubação de linfócitos com anti-CD2, 52,3% das células apresentaram fluorescência. Por outro lado, quando os linfócitos foram previamente incubados com FIL, apenas 6,6% eram fluorescentes, demonstrando intensa inibição de fluorescência devido à presença de fração protéica. Com a finalidade de analisar melhor esses resultados foram realizados experimentos adicionais em citometria de fluxo, onde se observou que a proteína de M.O. de *B. glabrata* (FIL) foi capaz de inibir parcialmente a interação do anticorpo monoclonal anti-CD2 com o receptor de membrana de linfócitos T (tubos 2 a 4), em comparação com os grupos controles (tubos 1, 5 e 6). Entretanto, a intensidade da inibição neste grupo de experimentos, não foi igual àquela observada pelo método de imunofluorescência em microscópio com epiluminação. Pela citometria de fluxo, o nível máximo de inibição da interação do anticorpo monoclonal anti-CD2 com o receptor de membrana de linfócito T foi de aproximadamente 40% (tubo 4).

FIGURA VI

Inibição parcial da ligação do anticorpo monoclonal anti-CD2 à linfócitos T humanos previamente incubados com proteína de M.O. de *B. glabrata*.  
Análise por citometria de fluxo.



Linfócitos incubados 5hs com F-III à temperatura ambiente. Após lavagem as células foram ressuspensas em meio completo ( $1 \times 10^6$ /ml) e colocadas em presença de anticorpo monoclonal anti-CD2. \* Concentrações de F-III: Tubo 2 = 19,6µg de proteína; Tubo 4 = 588µg de proteína.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

As lectinas têm sido muito úteis nos estudos envolvendo a modulação da resposta imune celular<sup>14</sup>. Muitos receptores biologicamente importantes da membrana de linfócitos humanos, entre eles a imunoglobulina das células B, os receptores para antígeno de células T, moléculas específicas do Complexo Principal de Histocompatibilidade e o receptor para insulina, foram isolados através de cromatografia de afinidade com lectinas de plantas de especificidades definidas<sup>12,21</sup>.

Trabalhos anteriores realizados em nosso laboratório demonstraram que a lectina de *B.glabrata* (variedade albina), embora não apresente-se propriedade leucoaglutinante, possuía atividade de interação com linfócitos T humanos, inibindo formação de rosáceas com eritrócitos de carneiro<sup>22,23</sup>.

Com base nessas considerações, a fração 30-70%, obtida pela semipurificação com sulfato de amônia, por ter sido a que apresentou melhor atividade com hemácias e linfócitos, foi submetida à cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-50-120. Esse processo permitiu a obtenção de três frações protéicas com atividades distintas, sendo uma ativa apenas para hemácias do sistema ABO humano (F-I), outra ativa apenas para linfócitos humanos (F-III), enquanto que F-II mostrou-se ativa para as duas populações (Figura I). A purificação de diversas lectinas de origem vegetal ou animal tem sido realizada por processos semelhantes, utilizando precipitação fracionada com sulfato de amônia e cromatografia de afinidade<sup>25</sup>. Embora o processo de purificação da proteína de M.O. de *B.glabrata* utilizado neste estudo necessite aprimoramento através da utilização de outros tipos de separação cromatográfica, os dados da Figura I demonstram que a atividade hemaglutinante desta lectina é factível de separação da proteína que apresenta a propriedade de interação com linfócitos (FIL). Este fato evidencia a propriedade do DEAE-Sephadex A-50-120, não apenas de separar as atividades, mas principalmente de preservar as mesmas durante o processo utilizado.

Experimentos de monitoração do processo de purificação realizados através de testes de hemaglutinação, permitiram demonstrar a propriedade hemaglutinante da lectina para hemácias humanas dos grupos, A, B e AB, sendo que a adição de íons  $Ca^{++}$  e  $Mg^{++}$  favoreceu tal atividade. Esses dados confirmam resultados anteriores de hemaglutinação<sup>4,18</sup> além de permitirem demonstrar a propriedade hemaglutinante da lectina de *B.glabrata* (variedade albina) para hemácias humanas do sub-grupo A1, previamente tipadas com a lectina de *Dolichos biflorus*. Tal fato não havia sido demonstrado nas investigações anteriormente realizadas.

Em outro grupo de experimentos, avaliou-se o efeito da proteína de M.O. de *B.glabrata* (FIL) sobre a for-

mação de RE. Para isso, foram determinadas as condições ideais relativas ao tempo e à temperatura de incubação. LUBAR et alii<sup>9</sup>, sugerem que os receptores para as lectinas são móveis na superfície celular e que as alterações topográficas são dependentes da temperatura. Por outro lado, tem sido demonstrado que o fenômeno de rosáceas pode ser inibido em temperaturas superiores a 30°C<sup>10,15</sup>. Foi possível observar com 5 horas de incubação a 25°C, que a proteína de M.O. de *B.glabrata* provoca intensa inibição na formação de rosáceas-E (RE=2,5%; controle=53,4%; inibição de RE-95,1%) sem comprometer a viabilidade celular (98%).

Os ensaios com diluições da FIL, tanto no extrato bruto, F-30-70% e F-III pretendiam caracterizar, através da diluição máxima da solução contendo FIL, qual seria a concentração mínima de proteína capaz de inibir a formação de RE. Desta forma, pode-se observar que após a cromatografia em DEAE-Sephadex, F-III atingiu um grau de purificação de 5,38 vezes em relação ao extrato bruto, considerando que F-III na concentração de 6,3µg de proteína ainda produzia um alto índice de inibição de RE, enquanto o extrato bruto necessitava de 33,9µg de proteína para atingir inibição semelhante (Figura III).

As atividades biológicas das lectinas normalmente são reversíveis pelo uso de inibidores específicos<sup>8,11,20</sup>. Ensaios com açúcares inibidores caracterizam as ceto hexoses como inibidores apenas da atividade hemaglutinante (Tabela 2 e 4), não ficando caracterizado nenhum dos açúcares testados como inibidor da FIL. Este fato, aliado aos resultados obtidos no processo de purificação, reforçam a existência de pelo menos duas proteínas distintas. Uma com atividade lectínia hemaglutinante e outra com atividade de interação com linfócitos, que não pode, neste estudo, ser chamada de lectina pela ausência, até o momento, da caracterização de um açúcar inibidor. Vários outros açúcares vêm sendo testados na busca de um inibidor preferencial da atividade com linfócitos.

Com a finalidade de esclarecer o nível de interação entre a FIL isolada de M.O. de *Biomphalaria glabrata* e o linfócito T humano, foram realizados experimentos com anticorpos monoclonais anti-CD2. Esses anticorpos inibem a formação de RE, além de inibirem a citotoxicidade celular mediada por linfócitos T e a resposta proliferativa a antígenos e mitógenos<sup>24</sup>. Baseado nesses dados, o receptor CD2 da membrana de linfócitos T é considerado atualmente como uma molécula sinalizadora e de adesão celular.

Nossos resultados indicam que a FIL bloqueia o sítio de ligação do anticorpo monoclonal anti-CD2, tanto por imunofluorescência indireta quanto por citometria de fluxo, embora por citometria de fluxo, nós tenhamos observado uma intensidade de inibição bem inferior àquela observada por IFI comum.

Isso provavelmente se deve à maior precisão na análise por citometria de fluxo e também ao fato de que o anticorpo monoclonal anti-CD2, por ser bastante específico e dirigido contra uma pequena região da molécula CD2, não seja completamente bloqueado pela proteína, que pode estar ocupando regiões próximas ao sítio de ligação com o anticorpo, deixando espaço para a interação entre ambos, mas impedindo a formação de RE, através da interação entre CD2 e a glicoproteína LFA-3 na membrana do eritrócito. Experimentos adicionais serão necessários para confirmar se a FIL e o anticorpo monoclonal ocupam o mesmo epitopo na molécula CD2 (Figura VI).

Tomados em conjunto, os resultados obtidos no presente estudo representam uma contribuição relevante para o estudo de lectinas, ao confirmar originalmente, as atividades biológicas da proteína obtida de M.O. de *B. glabrata* para eritrócitos e para linfócitos T humanos, além de sugerirem a existência de dois componentes distintos, factíveis de separação, sendo um com atividade de lectina e outro com atividade para linfócitos T humanos, possivelmente pela interação com receptor CD2.

Nesse ponto, é interessante comparar as atividades biológicas da proteína de *B. glabrata* com as observa-

ções relatadas com lectinas de diversas origens. De acordo com LIS & SHARON<sup>11</sup>, diversos grupos têm tentado separar as várias atividades de lectinas obtidas de uma mesma fonte animal ou vegetal. O exemplo mais esclarecedor sobre esse particular é o da fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA), caracterizada por 5 isolectinas com afinidades distintas para eritrócitos e leucócitos<sup>17,17</sup>.

Esses dados aliados à aplicabilidade crescente de lectinas no campo da imunologia, nos estimulam a desenvolver experimentos de cultura de linfócitos com a finalidade de verificar se a FIL é mitogênica para essas células e, se não for, em que nível de atividade linfocitária ela poderia estar atuando. Em paralelo, protocolos adicionais de purificação e caracterização bioquímica da lectina estão sendo desenvolvidos, além da determinação da especificidade da interação com a molécula CD2, em comparação com experimentos de ligação a outros receptores de membrana de linfócitos T.

#### Agradecimentos

Agradecemos de forma especial à Dra. Zancan, Dra. Noemi Farah Pereira e à Dra. Iara José Taborde de Messias.

RIALA6/790

UTIYAMA, S. R. et alii - Evaluation of hemagglutination activity and lymphocyte T interaction in the fraction partially purified from spawn lectin of *Biomphalaria glabrata*. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 56(1):1-12, 1996.

**ABSTRACT:** The extraction and fractional precipitation of proteins from egg masses of the snail *B. glabrata* (var. albin), with ammonium sulfate, produced a 30-70% saturation fraction that was able to interact with human T lymphocytes, besides the original hemagglutinating lectinic activity.

The fraction was submitted to chromatography on DEAE-Sephadex A 50-120 and three further fractions were obtained with distinct biological activities: F-I) hemagglutinating fraction; F-II) lymphocyte interaction fraction and F-III) fraction with both activities. Lymphocyte interaction (LIF) has revealed to be a potent inhibitor of spontaneous E rosette formation with T lymphocytes. Such inhibition was not affected by Ca<sup>++</sup> and Mg<sup>++</sup> ions and was not reversed in the presence of preferential inhibitors of hemagglutination (ceto-hexoses) or other sugars. Further more, rosette formation was not inhibited when sheep red blood cells were previously incubated with LIF.

Indirect Immunofluorescence assays and flow cytometry have demonstrated that LIF blocked the binding of the anti-CD2 monoclonal antibody to the lymphocyte membrane receptor, strengthening preliminary data obtained with E rosette inhibition assays.

**DESCRIPTORS:** Lectin, Snail, Lymphocytes, *B. glabrata*.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALLEN, L.W.; SVENSON, R.H. & YACHNIN, S. - Purification of mitogenis proteins derived from *Phaseolus vulgaris*: isolation of potent and weak phytohemagglutinin possessing mitogenic activity. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 63:334-41, 1969.
2. BARONDES, S.H. - Lectins: their multiple endogenous cellular functions. *Ann. Rev. Biochem.*, 50:207-31, 1981.
3. BRETTING, H.; STANISLAWSKI, E.; JACOBS, G. & BECKER, W. Isolation and characterization of a lectin from the snail *B. glabrata* and a study of its combining site. *Biochim. Biophys. Acta.*, 749:143-52, 1983.
4. DUARTE, M.E. - Lectinas de massas de ovos de moluscos do gênero *Biomphalaria*. *Dissertação, Mestrado, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná*, 1980.

5. DUARTE, M.E.; G.R.; DUARTE, H.S.; JACOMINI, M.; FONTANA, J.D. & DUARTE, J.H. - Purificação e caracterização da lectina de massas de ovos de *B. straminea*. *Arq. Biol. Tecnol.*, 24(1): 151, 1981.
6. DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. & SMITH, F. - Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28:350-6, 1956.
7. FELSTED, R.L.; LEAVITT, R.D.; CHEN, C.; BACHUR, N.R. & DALE, R.M.K. - Phytohemagglutinin isolectin subunit composition. *Biochim. Biophys. Acta*, 688: 1323-40, 1981.
8. GOLDSTEIN, I.J. & HAYES, C.E. - The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv. Carbohydr. Chem.*, 35:127-340, 1978.
9. INBAR, M.; BEN-BASSAT, H. & SACHS, L. - A specific metabolic activity on the surface membrane in malignant cell transformation. *Proc. Nat. Acad. Sci. - USA*, 68: 2748-51, 1971.
10. LAY, W.A.; MENDES, N.F.; BIANCO, C. & NUSSENZWEIG, V. - Binding of sheep red blood cells to a large population of human lymphocyte. *Nature*, 230:531-2, 1971.
11. LIS, H. & SHARON, N. - The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). *Ann. Rev. Biochem.*, 42:541-74, 1973.
12. LIS, H. & SHARON, N. - Lectin as molecules and as tools. *Ann. Rev. Biochem.*, 55:35-67, 1986.
13. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARRA, A.L. & RANDAL, R.J. - Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-75, 1951.
14. MARCHALONIS, J.J. - Lectins in the isolation of receptors on lymphocytes. *Methods in Enzymology*, 150:463-77, 1987.
15. MENDES, N.F.; TOLNAI, M.E.A.; SILVEIRA, N.P.A.; GILBERTSEN, R.B. & METZGAR, R.S. - Technical aspects of the rosette tests used to detect human complement receptors and sheep erythrocyte binding (T) lymphocyte. *J. Immunol.*, 111(3):860-7, 1973.
16. MICHELSON, E.H. & DUBOIS, L. - Agglutinin and lysins in the molluscan family *Planorbidae*: a survey of hemolymph, egg-masses and albumen-gland extracts. *Biol. Bull.*, 153:219-27, 1977.
17. MILLER, J.B.; NOYES, C.; HEINRIKSON, R.; KINGDON, H.S. & YACHNIN, S. - Phytohemagglutinin mitogenic proteins. *J. Exp. Med.*, 138:939-51, 1973.
18. SAMPAIO, F.J.C. - Estudo sobre hemaglutininas de glândula de albumen de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila*. *Dissertação, Mestrado, Universidade Federal do Paraná*, 1973.
19. SAMPAIO, F.J.C.; DMYTRACZENKO, A. & DUARTE, J.H. - Studies on lectins from the snails *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila*. *Inter. Res. Commun. System.*, 1:2-5, 1973.
20. SHARON, N. & LIS, H. - Lectins: cell-agglutinating and sugar specific proteins. *Science*, 177:949-59, 1972.
21. SHARON, N. - Lectin receptor as lymphocyte surface markers. *Adv. in. Immunol.*, 34:213-98, 1983.
22. UTIYAMA, S.R.R.; DUARTE, M.E.R.; DUARTE, G.R.; FONTANA, J.D.; WUNDER, P.R. & DUARTE, J.H. - Biological activity of lectin isolated from egg masses of the snail *B. glabrata* (albin). *Arq. Biol. Tecnol.*, 32 (1): 149, 1989.
23. UTIYAMA, S.R.R. - Interação da lectina de massas de ovos de *Biomphalaria glabrata* (variedade albina) com linfócitos humanos. *Dissertação, Mestrado, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná*, 1991.
24. WUNDER, P.R. - Inibidor sérico da resposta linfoproliferativa à interleucina 2. Possível associação com T11 (CD2). *Tese, Doutorado, Escola Paulista de Medicina*, 1987.
25. YATOHGO, T.; NAKATA, M.; TSUMURAYA, Y.; HASHIMOTO, Y. & YAMAMOTO, S. - Purification and properties of a lectin from the fruitbodies of *Flamulina Velutides*. *Agric. Biol. Chem.*, 52(G): 1485-93, 1988.

Recebido para publicação em 11/07/95