



Revista Brasileira em Promoção da Saúde

ISSN: 1806-1222

rbps@unifor.br

Universidade de Fortaleza

Brasil

Pinho Pereira, Márcio Roberto; Florindo Guedes, Maria Izabel
Imunização oral e alergenicidade induzida por proteínas de sementes de *Lablab purpureus* (L.) Sweet
em camundongos e sua modulação por carboidratos
Revista Brasileira em Promoção da Saúde, vol. 18, núm. 2, 2005, pp. 90-97
Universidade de Fortaleza
Fortaleza-Ceará, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=40818207>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

IMUNIZAÇÃO ORAL E ALERGENICIDADE INDUZIDA POR PROTEÍNAS DE SEMENTES DE *Lablab purpureus* (L.) Sweet EM CAMUNDONGOS E SUA MODULAÇÃO POR CARBOIDRATOS

Oral Immunization and Allergenicity Induced by Lablab purpureus (L.) Sweet Seeds Proteins in Mice and Their Modulation by Carbohydrates

Artigo original

RESUMO

O feijão Mangalô (*Lablab purpureus* (L.) Sweet) é consumido em várias regiões do mundo, inclusive no Brasil. Esta leguminosa contém Lectinas, que são glicoproteínas capazes de ligar-se a glicoconjungados e estimular várias respostas biológicas. O presente trabalho é um estudo da capacidade imunogênica de proteínas de sementes de *Lablab purpureus* em camundongos quando imunizados pela via oral. Também foi analisada a capacidade das Lectinas de modular a resposta imune humoral quando associadas a ovalbumina (OVA) e quando associadas a diferentes carboidratos. Grupos de camundongos foram imunizados respectivamente com extrato total (ET) de *L. purpureus*, com ET de *L. purpureus* associado com OVA e com ET de *L. purpureus* associado com diferentes carboidratos pela via oral. Os animais alimentados com ET de *L. purpureus* sintetizaram anticorpos sorológicos específicos anti-ET e o Immunoblotting revelou que as proteínas de alto peso molecular (acima de 45kDa) foram responsáveis por tal resposta. A síntese de anticorpos anti-ET foi inibida respectivamente por N-Acetyl-D-Glicosamina ($p<0,05$), seguida de Manose, Glucose e Galactose quando associados ao ET. O ET não demonstrou exercer nenhum efeito modulador quando associado a Ovalbumina. Conclui-se que as proteínas do ET de *L. purpureus* induzem imunização oral e são modulados por diferentes carboidratos, mas a completa determinação dos efeitos adjuvantes das lectinas contidas no extrato total requer investigações complementares.

Descriptores: Formação de anticorpos; Lectinas; Glicoconjungados.

ABSTRACT

The Mangalô bean (*Lablab purpureus* (L.) Sweet) is consumed in many places around the world, including Brazil. These leguminous contain Lectins, which are glycoproteins that bound to glico-conjugates and induce many biological responses. The present study is a research on the immunogenic capacity of the *Lablab purpureus* seeds proteins in orally immunized mice. The lectins' ability to act as humoral immune response modulators when associated to egg albumin (OVA) and carbohydrates was also analyzed. Mice groups were immunized respectively with *L. purpureus* total extract (ET), with *L. purpureus* ET associated to OVA and *L. purpureus* ET associated with different carbohydrates, by oral route. The mice fed with the *L. purpureus* total extract (ET) synthesized specific serological antibodies anti-ET and that response was due to the proteins of high molecular weight (above 45kDa). When the ET was associated to different sugars, the synthesis of specific antibodies anti-ET was mostly inhibited by N-Acetyl-D-Glucosamine ($p<0.05$), followed by Manose, Glucose and Galactose. The ET did not show any modulator effect when associated to egg albumin. The *L. purpureus* total extract proteins induce oral immunization, but the complete determination of the possible adjuvant effects of lectins contained in the ET needs further investigation.

Descriptors: Antibody Formation; Lectins; Glicoconjugates.

Márcio Roberto Pinho Pereira⁽¹⁾
Maria Izabel Florindo Guedes⁽²⁾

1) Biólogo, Professor-mestre de Imunologia
UNIFOR).

2) Agrônoma, Professora-doutora de
Imunologia da Uece.

*Recebido em: 29/09/2004
Revisado em: 21/03/2005
Aceito em: 11/04/2005*

INTRODUÇÃO

A imunização oral é um procedimento de imunização quando um imunógeno é administrado a partir da cavidade bucal. Esse processo geralmente requer uma quantidade grande de antígeno para ultrapassar a barreira do trato gastrintestinal. Quando proteínas solúveis e carboidratos são administrados por meio da via oral para esse fim, induzem preferencialmente a supressão da resposta imune antígeno-específica a partir da ativação de linfócitos T supressores e anergia de linfócitos Th CD4+ consolidando na supressão de anticorpos IgE e IgG específicas no soro. Esse fenômeno é conhecido como tolerância oral^(1, 2, 3, 4).

Antígenos bacterianos e virais em contato com a superfície mucosa do intestino levam a formação de IgA secretora (SIgA) específica em direção ao lúmen do trato gastrintestinal pelo Tecido Linfóide Associado à Mucosa (MALT) exercendo um papel protetor contra bactérias e neutralizando os vírus e as toxinas bacterianas^(5, 6, 7), mas os mecanismos envolvidos na resposta imune ao nível sistêmico, quando antígenos são administrados pela via oral, ainda não foram bem esclarecidos⁽⁸⁾.

As lectinas, proteínas ou glicoproteínas de origem não imune e não enzimática que se ligam de modo reversível a diferentes carboidratos, estão enquadradas em um grupo de antígenos especiais que conseguem induzir uma resposta imune sistêmica ao invés da preferencial tolerância imunológica quando administradas pela via oral^(9, 10, 11). As lectinas estão presentes em vários alimentos como sementes de leguminosas, amendoim, tomates, morango e quando ingeridas podem influenciar nas respostas metabólicas do trato alimentar, onde as lectinas podem, inclusive, exercer efeitos tóxicos como: indução na liberação das Interleucinas alergênicas IL-4 e IL-13 em basófilos (Hass, 1999) e de histamina em mastócitos⁽¹²⁾ facilitando, dessa forma, as reações de hipersensibilidade; mudanças patológicas no epitélio do intestino⁽¹¹⁾; e possível efeito carcinogênico^(13, 14). Devido aos efeitos tóxicos conhecidos das lectinas de semente de *Lablab purpureus*, anteriormente denominada *Dolichos lablab*^(15, 16), e a importância dessa leguminosa na alimentação de várias populações do Brasil, em especial na Bahia, e no mundo⁽¹⁷⁾, foi de nosso interesse estudar o possível efeito imunogênico das proteínas da semente de *L. purpureus* pela via oral, e o possível papel imunomodulador das lectinas presentes no Extrato Total (ET) nos mecanismos de imunização.

MÉTODOS

Reagentes e Material:

Os anticorpos (anti-mouse Immunoglobulins peroxidase e anti-mouse IgG peroxidase), a orthophenylenediamine (OPD), o Comassie Brilhant Blue R-250 e a Membrana de Nitrocelulose (0,2 mm) e os açúcares GliNAc, Manose, Glicose e Galactose foram provindos da Sigma. Placas de ELISA U96-POLYSORP-NUNC-IMMUNO PLATE BATCH 016181) foram provindos da Cultilab. Quitina, usada para preparar a coluna de afinidade, foi obtida a partir da carapaça de lagostas do litoral da cidade de Fortaleza, Brasil. Os camundongos foram doados pelo Biotério Central da UFC.

Obtenção do Extrato Total e da Fração 0-70%:

O ET foi obtido da farinha de sementes de *L. purpureus* por solubilização das proteínas em tampão PBS, contendo NaCl 0,15 M na proporção de 1:10 (p:v) com agitação ‘overnight’ constante, seguida por centrifugação a 10.000 rpm por 45 min a 4°C. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante, chamado de ET, foi em seguida filtrado, liofilizado e armazenado em frasco limpo a 4°C. Com a finalidade de se obter uma fração mais rica em lectina, parte do Extrato Total foi precipitado com sulfato de amônio até 70% de saturação. Após 4 horas de repouso, tempo necessário para a precipitação das proteínas, o material foi centrifugado a 10.000g por 45 minutos em centrifuga refrigerada e o precipitado resultante foi dissolvido em tampão PBS 0,025 M contendo NaCl 0,15 M, dializado exaustivamente contra água destilada, liofilizado e acondicionadas em frascos herméticos guardados a 4°C até o uso posterior. O total de proteínas, tanto do ET quanto da fração 0-70%, foi quantificado pelo método de Bradford⁽¹⁸⁾.

Cromatografia de Afinidade:

A fração 0-70% do ET diluída em 0,025M de PBS foi eluída em uma coluna de quitina com um fluxo constante de 0,5mL por minuto preparada de acordo com Leopoldo *et al.*⁽¹⁹⁾ com o objetivo de separar as lectinas com afinidade para N-acetyl-D-glicosamina das demais proteínas⁽¹⁹⁾. A fração retida em quitina (Q2) foi eluída em HCl 0,1M, dializada contra água destilada e liofilizada.

Imunização dos Animais:

O primeiro grupo foi imunizado pela via oral com 100 mg de proteína do ET durante 10 dias consecutivos. Outros 4 grupos de 10 animais foram tratados da mesma forma que

o anterior, sendo que o ET era associado aos respectivos açúcares N-acetil-D-glicosamina, Manose, Glicose e Galactose numa concentração final de 0,25M. O sexto grupo alimentado com 100 mg de OVA durante 10 dias consecutivos para controle negativo e o próximo grupo foi tratado da mesma forma que o anterior, sendo a OVA associada a 100 mg de proteína do ET. O último grupo foi imunizado com 10 mg de proteínas do ET pela via subcutânea, com reforço no 21º dia.

Obtensão dos Antissoros:

Os animais imunizados pela via oral foram sangrados pelo plexo retro-orbital antes da imunização (pré-imune) e nos dias 7, 14, 21, 28, 35 e 42 após a última imunização. Os animais imunizados pela via subcutânea foram sangrados 28 dias após a primeira imunização. O sangue foi deixado em repouso durante duas horas para retração do coágulo. O antissoro foi recolhido, centrifugado a 3000xg por 5 minutos para ficar livre das hemácias e armazenado a -20°C.

Determinação dos Anticorpos Específicos:

Os antissoros foram submetidos aos testes de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) indireto para determinação de anticorpos específicos. Os antissoros foram submetidos ao teste de ELISA indireto. Para esse ensaio, as placas '96 well' foram sensibilizadas com 4 µg de cada antígeno (ET de *Lablab purpureus* e OVA) diluídos em PBS sendo usado 100 µL em cada poço. As placas foram incubadas 'overnight' a uma temperatura de 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas com tampão ELISA (0,15 M NaCl, 0,014 M KH₂PO₄, 0,026 M KCl, 0,08 M Na₂HPO₄.7H₂O, pH 7,2) contendo Tween-20 (0,05 %) e bloqueadas por 2 h a uma temperatura de 37°C em tampão de bloqueio (tampão ELISA 10mM, pH 7,2, contendo 5% de BSA).

Após a lavagem das placas, foram adicionados 100mL dos antissoros (obtidos de camundongos imunizados por via oral) diluídos em série (1 : 10 a 1:1280) em tampão de bloqueio nos devidos poços e as placas foram incubadas 'overnight' a uma temperatura de 4°C. As placas foram novamente lavadas e em cada uma adicionado o conjugado imunoglobulinas policlonais anti-mouse ligadas à peroxidase, em uma diluição de 1:1.000 em tampão de ELISA 10mM, pH 7,2 contendo 5% de BSA, por 2 h a uma temperatura de 37°C.

A seguir, as placas foram lavadas com tampão ELISA contendo Tween-20. A reação foi desenvolvida pela adição de orthophenylenediamine (OPD) após a placa ter sido incubada por 20 minutos a temperatura de 37°C. A intensidade da reação foi avaliada espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 492 nm com um micro Elisa

Labystems Multiskam MS. Os anticorpos anafiláticos IgE e IgG1 foram quantificados por PCA como descrito por Ovary⁽²⁰⁾ e modificado por Mota & Wong⁽²¹⁾. O título de PCA foi definido como logarítmico na base dois do inverso da diluição máxima do antissoro capaz de provocar uma reação cutânea positiva.

Immunoblotting

O ET e o Q2 (20mg) foram submetidos a uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% (SDS-PAGE) como descrito por Laemmli⁽²²⁾. As proteínas que foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em uma cuba de eletrotransferência vertical marca HÖEFFER com uma solução tampão de transferência composta de glicina 39 mM, SDS 0,0375% (m/v) e metanol 20 % (v/v) em tampão Tris-HCl 48 mM, pH 7,2, sob as condições de amperagem constante de 150 mA fornecida por uma fonte marca PHARMACIA BIOTECH, modelo EPS-600 usando o programa (Bio-Rad V=300, mA=150 e W=30) em câmara fria num tempo de 2 horas na cuba de transferência. Em seguida, a membrana foi incubada com uma solução tampão de PBS com 5% de BSA a 4°C por aproximadamente 18 horas, para bloqueio dos sítios ativos livres da membrana.

Após a incubação, as membranas foram lavadas quatro vezes por 15 minutos, com a solução tampão PBS-BSA (5%), sob leve agitação. A membrana lavada foi imersa em tampão PBS-BSA (5%) contendo o antissoro obtido da imunização oral, numa diluição de 1:20 e incubadas por duas horas. Uma outra membrana foi encubada com PBS-BSA (5%) com o antissoro obtido da imunização subcutânea, numa diluição de 1:500. Em seguida as membranas foram submetidas a quatro lavagens de 15 minutos em PBS-BSA (5%) e transferidas para uma placa de petri contendo o 2º anticorpo, Imunoglobulinas Polivalentes anti-camundongo ligado a peroxidase, na diluição de 1:1000 em PBS-BSA (5%) por duas horas sob leve agitação em temperatura ambiente. As membranas foram novamente submetidas a quatro lavagens de 15 minutos em PBS-BSA e foram colocadas em uma solução reveladora, com substrato para peroxidase, composta de diaminabenzidina (DAB) 0,1 g/mL e Cloreto de Níquel (NiCl₂) 0,4 g/mL em tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,2, sendo adicionado 14 mL de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) 30V, sendo mantidas no escuro à temperatura ambiente por aproximadamente 30 minutos, quando então a reação foi interrompida com a lavagem da membrana com água destilada.

Análise Estatística

A análise estatística da inibição da resposta imunológica pelos açúcares foi feita pelo programa "GraphPad Prism"

pelo método de ANOVA, que analisa dois ou mais grupos em relação ‘a um grupo controle.

RESULTADOS

Cromatografia de Afinidade:

A fração 0-70% do ET que foi obtida por meio da precipitação por sulfato de amônio foi submetida a uma cromatografia de afinidade, revelando a presença de dois picos como mostra a Fig 1.

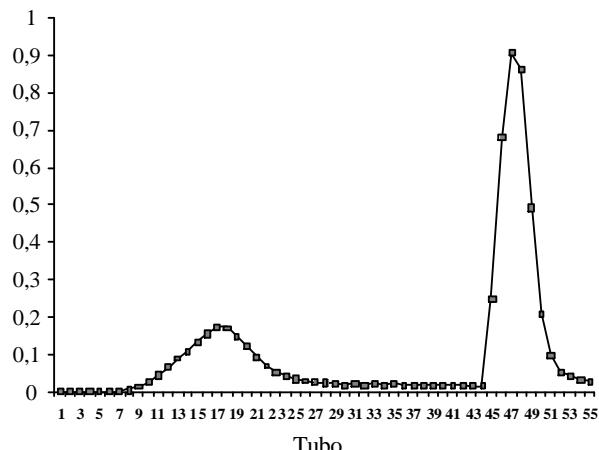


Figura 1: Cromatografia da Fração 0-70% em coluna de Quitina num fluxo constante de 0,5mL por minuto. A leitura da absorbância em 280nm foi feita em cada amostra contida nos tubos.

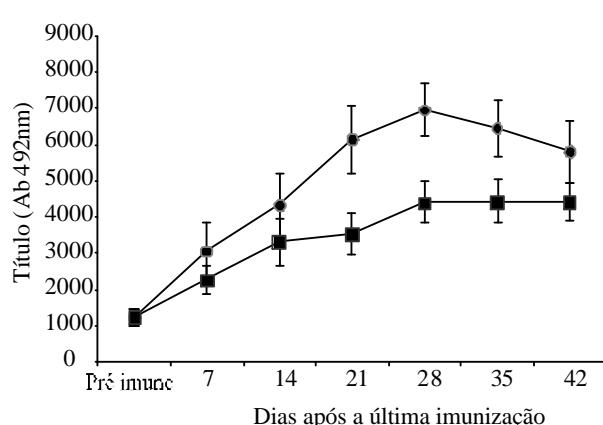


Figura 2: Cinética da síntese de anticorpos em camundongos imunizados com 100mg de proteína do ET de *L. purpureus* pela via oral durante 10 dias consecutivos avaliada por ELISA. O título corresponde à média ± DP da soma dos valores das absorbâncias lidas das diluições do soro, entre 1:10 e 1:1280). Síntese de imunoglobulinas IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM e IgA, síntese de IgG.

Cinética da Síntese de Anticorpos Específicos Conta o ET avaliada por ELISA:

A figura 2 mostra que os animais alimentados com as proteínas do ET sintetizaram imunoglobulinas totais específicas anti-ET (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA e IgM). Das classes de imunoglobulinas avaliadas, a classe IgG se mostrou predominante. Pode ser notado que a síntese de anticorpos obedece a uma cinética de tempo/dependente. As duas cinéticas parecem obter o máximo de síntese de anticorpos no 28º dia, e permanecendo constante.

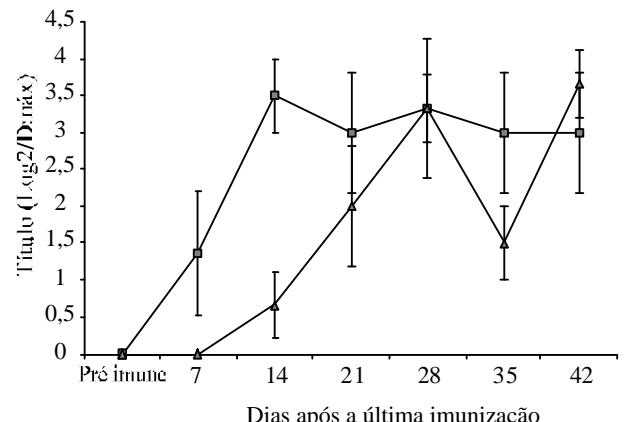


Figura 3: Cinética da síntese de anticorpos IgE e em camundongos imunizados com 100mg de proteína do ET de *L. purpureus* pela via oral durante 10 dias consecutivos avaliada por PCA. Síntese de IgG1 (●) e IgE (■).

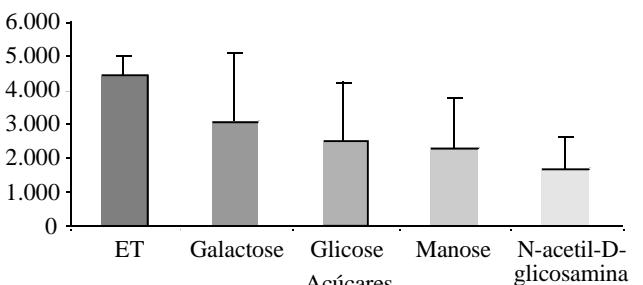


Figura 4: Título de anticorpos IgG no soro do 28º dia em camundongos imunizados com 100mg de proteínas do ET de *L. purpureus* pela via oral durante 10 dias consecutivos associados a diferentes açúcares avaliado pelo método de ELISA (* p < 0,05).

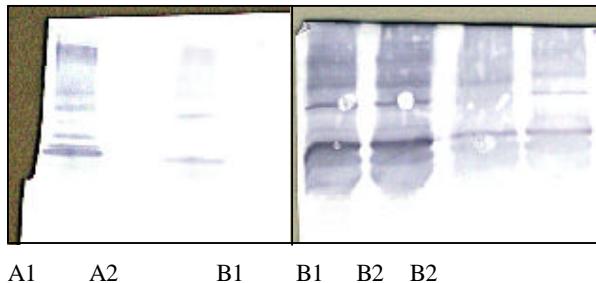


Figura 5: Imunoblotting dos soros dos camundongos imunizados com proteínas de *L. purpureus* pela via oral (A) e pela via subcutânea (B). 1- Extrato Total. 2- Pico cromatográfico QL-II.

Cinética da Síntese de Anticorpos Anafiláticos Contra o ET avaliada por PCA:

A reação qualitativa de anticorpo policlonal de camundongos foi detectada por PCA em rato (IgE e IgG1), contra ET é mostrada na Figura 3. Podemos observar que a síntese de anticorpos IgG1 anti-ET é detectada no 7º dia, chegando ao máximo de sua síntese no 14º dia e permanecendo estável, enquanto a síntese de IgE anti-ET obteve seu pico máximo no 28º dia, caindo no 35º, voltando a subir no 42º.

Inibição da Resposta Imunológica por Diferentes Carboidratos:

As sementes de *Lablab purpureus* possuem hemaglutininas com afinidade para diferentes carboidratos^(23, 24, 17, 19, 25). Devido a essas especificidades, procuramos avaliar a interferência desses carboidratos específicos, juntamente com as proteínas do ET na modulação da resposta imune ao nível sistêmico, quando ingeridos pela via oral.

Tabela 1: Teor de inibição da imunização dos camundongos alimentados com proteínas do ET de *L. purpureus* associado a diferentes açúcares. O teor de inibição foi calculado a partir do título de anticorpos específicos no soro dos camundongos sangrados no 28º dia após a última imunização.

| AÇÚCARES | TEOR DE INIBIÇÃO DA IMUNIZAÇÃO ORAL |
|------------------------|-------------------------------------|
| N-acetyl-D-glicosamina | 62,00% |
| Manose | 48,38% |
| Glicose | 43,62% |
| Galactose | 30,92% |

A tabela 1 mostra que síntese de anticorpos IgG foi inibida em diferentes níveis quando associado aos açúcares, sendo o inibidor mais potente a GliNAc, seguida de Manose,

Glicose e por último a Galactose. Mas apenas a inibição por GliNAc foi estatisticamente significante (Fig 4). Esses açúcares são conhecidos por inibirem a atividade hemaglutinante do ET^(17, 19) igualmente nessa ordem de preferência, com exceção da galactose que não inibe a atividade hemaglutinante do ET. Apesar disso, uma lectina com afinidade para galactose foi purificada a partir do ET de *L. purpureus*, mas em quantidade bastante baixa⁽¹⁹⁾.

Cinética da Síntese de Anticorpos Específicos Contra OVA:

Não foram detectados anticorpos específicos anti-OVA em animais alimentados apenas com Ovalbumina, ou em associação com o ET (resultados não mostrados).

Detecção de Anticorpos Específicos por Immunoblotting:

A figura 5 revela que as proteínas de maior peso molecular do ET de *L. purpureus* foram as responsáveis em induzir anticorpos sorológicos quando esse ET foi ministrado seja pela via oral, seja pela via subcutânea. Também pode ser observado que as bandas reveladas pelo soro obtido após a imunização oral são de menor intensidade que as bandas reveladas com o soro da imunização subcutânea. Além disso, as bandas do pico Q2 foram especificamente reconhecida pelos anticorpos produzidos por meio da imunização oral.

DISCUSSÃO

O MALT pode ser considerado um reservatório de células Th e CTL precursoras que respondem de diferentes formas aos抗ígenos. Quando抗ígenos protéicos em geral entram em contato com a mucosa intestinal, ocorre a indução de SIgA a partir de interações entre células B e T ativadas no MALT. Esse evento constitui o principal papel da imunidade da mucosa^(28, 7). Mas pouco se sabe sobre os aspectos imunológicos envolvidos na imunização oral quando proteínas são associadas a carboidratos.

É possível que os açúcares da dieta influenciem na qualidade dessas respostas imunes ao nível de mucosa, mas não se sabe até onde podem influenciar ao nível sistêmico⁽²⁹⁾. Acredita-se que a capacidade das lectinas induzirem uma resposta imune sistêmica pela via oral está relacionada com as suas especificidades de sua ligação a glicomoléculas presentes na superfície das células epiteliais da mucosa, sendo consequentemente internalizado e transportado para a circulação^(9, 4). É possível, então, quando as lectinas são associadas aos açúcares para os quais têm especificidade, a ligação da lectina com as glicomoléculas da mucosa intestinal não aconteceria uma vez que a lectina já estaria previamente ligada a seu açúcar específico. Assim, sua internalização para a circulação ficaria comprometida e a resposta imune

alterada. Nossos resultados corroboram com a hipótese de Aizpurua e Russell-Jones, já que o uso de açúcares específicos para as lectinas contidas no ET inibiu a imunização oral dos animais. Esses dados sugerem que, além das respostas imunes locais nas mucosas serem influenciadas pela presença de glícides na dieta, é possível influenciar também a resposta imune sistêmica.

Os resultados obtidos na análise por immunoblotting são uma evidência direta da participação de lectinas com afinidade para GliNAc na imunização oral. Tal lectina foi purificada e caracterizada por Leopoldo *et al.*⁽¹⁹⁾ o qual mostraram que o segundo pico (Q2) possui pelo menos duas lectinas com afinidade para GliNAc. Também pode-se notar que a intensidade da imunização subcutânea é bem maior, quando comparamos ao da imunização oral. Isso ocorre devido às características do trato gastrintestinal, onde os抗ígenos sofrem degradações devido às condições adversas, como o baixo pH e a presença de enzimas proteolíticas^(30, 31, 32, 33).

Observa-se que a síntese de anticorpos anafiláticos IgG1 ocorreu no 7º dia, tendo seu pico máximo no 14º e manteve-se estável. Por outro lado a IgE só foi detectada a partir do 14º dia, alcançando seu pico apenas no 28º, apresentando uma queda no 35º dia, voltando a crescer no 42º, o que mostra efeito tardio da resposta dessa imunoglobulina. Essa reação pode ser explicada pelo fato das lectinas presentes no ET ligarem-se às glicomoléculas da membrana plasmática de células residentes da lâmina própria como mastócitos e basófilos, induzindo a liberação de histamina e citocinas IL-4 e IL-13 precoce, onde terão participação na ativação de células Th2 e na resposta alérgica^(12, 34, 35). Além disso, já é conhecido o efeito mitogênico que lectinas de *L. purpureus* exercem sobre linfócitos T, potencializando a liberação de Interleucina-2 (IL-2) por estas células^(36, 37). Essas propriedades podem explicar o efeito alergênico de algumas sementes que contêm lectinas em diferentes quantidades, quando consumidas na dieta alimentar.

Apesar das lectinas induzirem uma resposta imune sistêmica após a imunização oral^(8, 9, 10), não há registro na literatura do efeito imunomodulador de lectinas, quando ministradas pela via oral, em animais. Baseado nos resultados de Aizpurua e Russell-Jones⁽⁸⁾, Kilpatrick⁽²⁹⁾ propôs que lectinas também poderiam agir como adjuvantes mucosos, carreando outras moléculas para o interior do organismo e, dessa forma, gerar uma resposta imune sistêmica contra抗ígenos que sozinhos não seriam capazes de induzi-la. Não conseguimos demonstrar, com base nesses resultados, o possível efeito imunoadjuvante mucoso de lectinas de *L. purpureus*, pois não foi detectado anticorpos anti-OVA no

soro dos animais nem quando a OVA era associada ao ET. A quantidade de ovalbumina administrada aos camundongos pode não ter sido suficiente para ter desencadeado uma resposta imune⁽³⁸⁾, ou até mesmo o fato da ovalbumina ter um resíduo de manose em sua estrutura pode ter influenciado nas interações moleculares da digestão, pois o ET de *L. purpureus* possui uma lectina com afinidade para esse açúcar. Além disso, sabe-se que a resposta imunológica quando induzida pela via oral é baixa, de curta duração e freqüentemente confinada às mucosas⁽³⁹⁾. Como se pode observar, não foi o que ocorreu com o ET de *L. purpureus*. Contudo, os resultados demonstram que a imunização oral induzida pelas proteínas do ET de *L. purpureus* tem a participação das lectinas, uma vez que essa imunização foi inibida por carboidratos específicos. O detalhamento do mecanismo da imunização oral depende de experimentos futuros.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq pelo apoio financeiro prestado.

REFERÊNCIAS

1. Mowat AM. Oral tolerance and regulation of immunity to dietary antigens. In: Ogra PL, Strober W, Mestecky J, McGhee JR, Lamm ME, Bienzenstock JE, editors. *Handbook of Mucosal Immunity*. San Diego: Academic Press; 1994. p.185-201.
2. Ke Y, Kapp JA. Oral antigen inhibits priming of CD8+ CTL, CD4+ T cells, and antibody responses while activating CD8+ suppressor T cells. *J Immunol*. 1996;156:916-21.
3. Sun J, Dirden-Kramer B, Ito K, Ernst PB, Van Houten N. Antigen-specific T cell activation and proliferation during oral tolerance induction. *J Immunol*. 1999;162:5868-975.
4. Gabius HJ. Probing the cons and pros of lectin-induced immunomodulation: case studies for the mistletoe and galectin-1. *Biochimie*. 2001;83:659-66.
5. Mazanec MB, Kaetzel CS, Lamm ME, Fletcher D, Nedrud JG. Intracellular neutralization of virus by immunoglobulin A antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89(15):6901-5.
6. Kiyono H, Fukuyama S. NALT- versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(9):699-710.

7. Borsutzky S, Cazac BB, Roes J, Guzman CA. TGF-beta receptor signaling is critical for mucosal IgA responses. *J Immunol.* 2004;173(5):3305-9.
8. Aizpurua HJ, Russell-Jones GJ. Oral vaccination. Identification of classes of proteins that provoke an immune response upon oral feeding. *J Exp Med.* 1988; 167(2):440-51.
9. Pereira MEA, Kabat EA. Immunochemical studies on lectins and their application to the fractionation of blood group substances and cells. *Crit Rev Immunol.* 1979;1:33-78.
10. Gómez E, Ortiz V, Ventura J, Campos R, Bourges H. Intestinal and systemic immune responses in rats to dietary lectins. *Adv Mucosal Immunol.* 1995;371A:533-6.
11. Bies C, Lehr CM, Woodley JF. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004;56:425-35.
12. Provost-Danon A, Weyer A, Silva-Lima M, Lapeyre J, Expert-Bezancon N, Delpierre A. Histamine release by Dolichos lablab lectin. In: Kallikorn A, Boghansen editors. *Lectins Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry;* 1992. vol. 8.
13. Ryder SD, Smith JA, Rhodes JM. Peanut lectin: a mitogen for normal human colonic epithelium and human HT29 colorectal cancer cells. *J Natl Cancer Inst.* 1992;84(18):1410-6.
14. Ryder SD, Smith JA, Rhodes EG, Parker N, Rhodes JM. Proliferative responses of HT29 and Caco2 human colorectal cancer cells to a panel of lectins. *Gastroenterol.* 1994;106(1):85-93.
15. Salgarkar S, Sohonie K. Hemaglutinins of field bean Dolichos lablab: PartI - Isolation, purification and properties of hemaglutinins. *Indian J Biochem.* 1965;2:193-96.
16. Manage L, Joshi A, Sohonie, K. Toxicity to rats and mice of purified phytohemagglutinins from four indian legumes. *Tóxico.* 1972;10:89-91.
17. Silva-Lima M, Pusztai A, Nunes DC, Farias ME. Hemmagglutinating activity of Dolichos lablab seed protein. *Braz J Med Biol Res.* 1988;21:219-22.
18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
19. Leopoldo PTG, Xavier-Filho J, Silva-Lima M. Lectins of Lablab purpureus seeds. *J Sci Food Agric.* 1994;65:179-83.
20. Ovary Z. Passive cutaneous anaphylaxis in the mouse. *J Immunol.* 1958;81:355-8.
21. Mota I, Wong D. Homologous and heterologous passive cutaneous anaphylactic activity of mouse anti-sera during the course of immunization. *Life Sci.* 1969;8:813-20.
22. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227:680.
23. Guran A, Tichá M, Filka K, Kocourek J. Isolation and properties of a lectin from the seeds of the indian bean Lablab (Dolichos lablab L.). *Biochem J.* 1983;209:653-7.
24. Kumar NS, Rao DR. The nature of the lectins from Dolichos lablab. *J Biosc.* 1986; 10: 95-109.
25. Mo H, Meah Y, Moore JG, Goldstein IJ. Purification and characterization of Dolichos lablab lectins. *Glicobiology.* 1999;9:173-9.
26. Ngan J, Kind LS. Suppressor T cells for IgE and IgG in Peyer's patches of mice made tolerant by the oral administration of ovalbumin. *J Immunol.* 1978;123:2337.
27. Melo VMM, Xavier-Filho J, Silva-Lima M, Prouvost-Danon A. Allergenicity and tolerance to proteins from Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* H. B. K.). *Food Agric Immunol.* 1994;6:185- 95.
28. Cerkinsky C, Anjuere F, Mcghee JR, George-Chandy A, Holmgren J, Kiieny MP, et al. Mucosal immunity and tolerance: relevance to vaccine development. *Immunol Rev.* 1999;170:197-222.
29. Kilpatrick DC. Immunological aspects of the potential role of dietary carbohydrates and lectins in human health. *Eur J Nutr.* 1999;38:107-17.
30. Maureen GB, Ferguson A. Oral tolerance to ovalbumin in mice: studies of chemically modified and 'biologically filtered' antigen. *Immunology.* 1986;57:627-30.
31. Van Der Heijden PJ, Bianchi ATJ, Dol M, Pals JW, Stock W, Bokhout BA. Manipulation of intestinal immune response against ovalbumin by cholera toxin and its B subunit in mice. *Immunology.* 1991;72:89-93.
32. Weiner HL, Friedman A, Miller SJ, Khouri A, Alsabbagh L, Santos M, et al. Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-

- specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:809
33. Bukawa CO, Holland SP, Dertzbaugh MT, Cuff CF, Anderson AO. Morphologic and functional alterations of mucosal T cell by cholera toxin and its B subunit. *J Immunol.* 1995;154:1032-40.
34. Haas H, Falcone FH, Schramm G, Haisch K, Gibbs F, Klaucke J, et al. Dietary lectins can induce in vitro release of IL-4 and IL-13 from human basophils. *Eur J Immunol.* 1999;29:918-27.
35. Sabra A, Bellanti JA, Rais JM, Castro HJ, De Inocencio JM, Sabra S. IgE and non-IgE food allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2003;90(3): 71-6.
36. Liz H, Sharon N. The lectins: their chemistry and application to immunology. In: Sela M. *The Antigens.* New York: Academic Press; 1977. p:429-529.
37. Favero J, Miquel F, Dornand J, Janicot M, Mani JC. Dolichos lablab agglutinin: a potent T lymphocyte mitogen and a high interleukin-2 promoter; In: *Lectins.* New York: Walter de Gruyter; 1986. Vol.5.
38. Knippels LM, Houben GF, Spanhaak S, Penninks AH. An oral sensitization model in brown norway rats to screen for potential allergenicity of food proteins. *Methods.* 1999;19:78-82.
39. Richman LK, Graeff AS, Strober W. Antigens presentation by macrophage enriched cell from the mouse Peyer's patch. *Cell Immunol.* 1981;62:1100-10.

Endereço para correspondência:

Marcio Roberto Pinho Pereira
Rua Dr. Gilberto Studart 955
Apto 802. Cocó. 60190-750.
E-mail: marcio_pereira@hotmail.com