UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Pós-graduação em
Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

EFEITO DAS FITO-HEMAGLUTININAS DE FEIJÕES
(*Phaseolus vulgaris* L.) SOBRE A MUCOSA INTESTINAL.

JORGE MANCINI FILHO

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Professor Dr. FRANCO M. LAJOLO

São Paulo

1982

10583

Aos meus pais
Martha e Jorge

A minha esposa
Dalva

Aos meus filhos
Jorgito,
Francisco Eduardo
Carlos Renato

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. Franco M. Lajolo pela amizade, pelo estímulo constante e pela valiosa orientação do presente trabalho.
- À Profa. Maria O. R. Figueroa pela prestímosa colaboração durante toda execução deste trabalho.
- Ao Prof. Dr. Marcos Rossi pela preciosa colaboração na execu -
ção da microscopia eletrônica.
- Ao Prof. Dr. Geraldo Hugo Silva pelo auxílio na montagem das
técnicas de eversão intestinal.
- Aos Profs. Drs. Antonio Walter Ferreira e Benedito Anselmo Pe-
res e ao farmacêutico-bioquímico Oswaldo Sunao Nakahara pela
colaboração na execução das técnicas imuno-enzimáticas.
- Aos colegas do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimen-
tal que mantêm toda a infra-estrutura de pesquisa e de ensino
incentivando a execução de trabalhos científicos.
- À FINEP, pelo suporte financeiro.

S U M Á R I O

	pág.
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Efeitos anti-nutricionais	1
1.2 - Hipóteses relativas ao mecanismo de ação das fi to-hemaglutininas	5
1.3 - Relação entre estrutura e ação	7
2 - OBJETIVOS	10
3 - MATERIAIS	11
3.1 - Lectinas	11
3.2 - Hemácias	11
3.3 - Animais	12
3.4 - Enzimas	12
3.5 - Caseína	12
3.6 - Rações experimentais	13
3.7 - Colunas de afinidade	13
4 - MÉTODOS	14
4.1 - Extração e purificação das fito-hemaglutininas.	14
4.2 - Preparo da coluna de afinidade	14
4.3 - Obtenção do sôro imune	15
4.4 - Testes imuno-enzimáticos	15
4.5 - Imuno-precipitação em gel	16
4.6 - Microscopia eletrônica	17
4.7 - Transporte de glicose nos intestinos evertidos.	17
4.8 - Determinação da glicose	17
4.9 - Determinação da atividade aglutinante	18
4.10 - Atividade da anti-tripsina e da anti-amilase	18
4.11 - Doseamento das proteínas	19
4.12 - Determinação de lípidos	19
4.13 - Determinação dos carboidratos totais	19

	pág.
4.14 - Determinação da atividade da maltase e da invertase	20
4.15 - Inativação das fito-hemaglutininas	20
4.16 - Determinação da glicose no soro	20
4.17 - Eletroforese em poliacrílamida	21
4.18 - Análise dos resultados	21
5 - RESULTADOS.....	22
5.1 - Caracterização das lectinas das variedades Jalo e Rico 23 quanto à aglutinação e toxicidade	22
5.2 - Purificação das fito-hemaglutininas das variedades Jalo e Rico 23	23
5.3 - Caracterização das fito-hemaglutininas pela imuno-precipitação em gel de ágar	28
5.4 - Ensaio imuno-enzimático das fito-hemaglutininas	30
5.5 - Efeito da associação de lectinas do feijão Rico 23 com lisados bacterianos, sobre o crescimento e dissacaridases intestinais	32
5.6 - Efeito da ingestão das fito-hemaglutininas sobre a digestibilidade aparente de proteínas, glícides e lípidos	34
5.7 - Efeito das fito-hemaglutininas sobre a absorção intestinal de glicose	36
5.8 - Microscopia eletrônica dos intestinos dos ratos submetidos ao consumo de ração contendo 1% de fito-hemaglutininas obtidas do feijão Jalo	38
5.9 - Efeito das aglutininas na absorção de glicose "in vitro"	43
6 - DISCUSSÃO	48
7 - CONCLUSÕES	65
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
SUMMARY	75

1 - INTRODUÇÃO

Os feijões (Phaseolus vulgaris L.) apresentam em sua constituição glicoproteínas características denominadas fito-hemaglutininas, lectinas ou simplesmente aglutininas, dotadas de propriedades como: aglutinar hemácias, glóbulos brancos⁽⁷⁾, células cancerosas⁽⁶⁰⁾; estimular a mitose em culturas de linfócitos⁽⁵⁹⁾ e serem tóxicas quando ingeridas na dieta⁽²⁹⁾.

1.1 - Efeitos anti-nutricionais

Do ponto de vista nutricional, muitos trabalhos visando ao conhecimento dos efeitos da ingestão de feijões ou de suas proteínas isoladas tem sido realizados. Os primeiros datam do início do século, destacando-se as investigações realizadas por FORD⁽²¹⁾, LANDSTEINER⁽⁴³⁾, GODDARD e MENDEL⁽²³⁾, entre outros.

A partir de 1949 foi dado um novo caráter a essas pesquisas ao tentar-se correlacionar a presença de lectinas com aspectos toxicológicos ou anti-nutricionais, sobressaindo-se os trabalhos de JAFFÉ na Venezuela e LIENER nos Estados Unidos.

Um dos trabalhos clássicos de JAFFÉ⁽²⁷⁾ publicado em

1949, relata a observação de que dietas contendo feijões crus, quando fornecidos para ratos, provocavam a morte, mesmo quando a proteína, presente em teores de até 20%, era previamente digerida, eliminando-se, assim, a possibilidade de outros inibidores (enzimáticos) estarem envolvidos como causa do efeito tóxico. Nessas experiências observou-se a presença de elevados teores de lectinas nos feijões, mas não se estabeleceu qualquer relação destas com o retardo observado no crescimento.

A existência em feijões, de um fator termolábil que era tóxico quando fornecido por via oral para animais, foi noticiado por JAFFÉ et al.⁽³⁵⁾, que observaram também uma redução na digestibilidade das proteínas e das gorduras ingeridas nas rações que continham este fator. Verificaram que os intestinos dos ratos que consumiam feijões crus, por um certo período, apresentavam absorção mais lenta de glicose, o que se devia a alguma substância, presente nos feijões, que interferia, de forma inespecífica na absorção normal do intestino. Por outro lado, não conseguiram detectar através da microscopia dos intestinos qualquer tipo de alteração morfológica.

JAFFÉ & GOMES⁽³³⁾ e JAFFÉ & FLORES⁽³²⁾, trabalhando com diferentes variedades de feijões, determinaram a DL₅₀ de "fito-hemaglutininas" e estudaram o comportamento de camundongos inoculados pelas vias intra-dérmica e intra-venosa. Estabeleceram, também, que a atividade aglutinante dos cultivares de feijões estudados, apresentava relação inversa com a capacidade de induzir o crescimento em ratas.

Das diversas frações protéicas encontradas nos feijões, ANDREWS e JAYNE-WILLIAMS⁽¹⁾, observaram que somente aquelas com

atividade aglutinante eram tóxicas quando fornecidas em rações, para codornas; conseguiram também relacionar altos títulos aglutinantes com alta letalidade.

KAKADE & EVANS⁽³⁸⁾, isolaram cinco frações do "Phaseolus" e verificaram que uma delas apresentava atividade aglutinante elevada e quando, ingerida por ratos, causava alta letalidade. Desta fração EVANS et al.⁽¹⁸⁾, separaram quatro sub-frações mas conseguiram associar apenas uma delas, possuidora de atividade aglutinante e mitogênica mais elevada do que as demais, com a alta toxicidade.

A partir de duas variedades de feijões, HONAVAR et al.⁽²⁵⁾, purificaram as fito-hemaglutininas e as incorporaram em rações, verificando-se que a ingestão em níveis de 0,5% e 1,2% das lectinas de "feijão comum" e do "preto", respectivamente, provocavam a morte dos ratos em quinze dias. Observaram, também, que a suplementação com metionina não eliminava a perda de peso e a morte dos animais. Da mesma forma JAFFÉ e LETTE⁽³⁴⁾, estudaram cinco variedades e avaliaram associadamente, através de ensaios "in vitro" e "in vivo": a atividade inibidora de enzimas proteolíticas, as hemaglutininas e o efeito sobre o crescimento de ratos. Os extratos de feijões provocavam perda de peso e morte, mesmo quando suplementados com metionina ou incorporados de caseína previamente digerida. As fezes dos animais que receberam os extratos de feijões, apresentavam proteínas com atividade aglutinante, às quais foi atribuída a toxicidade observada; a anti-amilase e as anti-tripsinas presentes, não pareciam estar relacionadas com a letalidade.

PUSZTAI e PALMER⁽⁶⁴⁾, verificaram que a utilização pro

têmica líquida (N.P.U.), em ratos, alimentados com rações contendo 5% de caseína, diminuía sensivelmente na presença de lectinas de feijões. Os autores chegaram a estabelecer a fórmula $N.P.U. = N.P.U. \cdot 5\% \text{ caseína} - 280 \cdot x$, para correlacionar a concentração de lectina (x) presente na ração com a utilização protéica. Opostoamente, verificaram ausência de toxicidade nas frações protéicas isentas de lectinas. Isolaram as fito-hemaglutininas albumínicas e globulínicas e verificaram que 0,2% e 0,1%, respectivamente, destas frações já provocavam diminuição do N.P.U. da caseína de 82 para 57.

Parece por outro lado que as aglutininas de variedades diferentes de feijões não são igualmente tóxicas. JAFFÉ & BRUCHER⁽³⁰⁾ e JAFFÉ & GOMEZ⁽³³⁾, classificaram experimentalmente as lectinas em quatro categorias em função da resposta aglutinante frente aos glóbulos vermelhos de bovino e de coelho e da toxicidade. Observações semelhantes foram feitas por MANCINI & LAJOLO⁽⁵³⁾, que, também, estabeleceram a provável existência de quatro tipos de lectinas com diferentes toxicidades.

PUSZTAI et al.⁽⁶⁶⁾ avaliaram comparativamente o N.P.U., digestibilidade e teores de lectinas de treze variedades de feijões observando que apenas duas não eram tóxicas para ratos; essas duas apresentavam menos aglutininas do que as demais.

Diversas revisões reunindo esses aspectos que apresentamos sobre a ação tóxica das lectinas dos feijões foram publicadas por JAFFÉ^(28,29) e LIENER^(47,48,49).

Em função dos trabalhos existentes na literatura, parece não haver dúvida, atualmente, que do ponto de vista biológico as lectinas são as principais responsáveis pelo efeito anti-nutri-

cional e letalidade causada pela ingestão de feijões crus.

A identificação das lectinas nas fezes dos animais que as consomem é um dado importante a ser considerado, pois caracteriza a resistência destas glicoproteínas ao pH e enzimas do trato digestivo^(20,30).

1.2 - Hipóteses relativas ao mecanismo de ação das fito-hemaglutininas

Do ponto de vista funcional as lectinas dos feijões, de forma semelhante ao de outras fito-hemaglutininas, interagem especificamente com resíduos de carboidratos existentes na membrana celular, tanto de glóbulos vermelhos ou brancos, células cancerosas ou mesmo de enterócitos^(51,72). Através desta propriedade de JAFFÉ & CAMEJO⁽³¹⁾, sugeriram como provável mecanismos anti-nutricional, a interação das lectinas com carboidratos ou glicoproteínas presentes na superfície dos enterócitos de maneira a formar uma espécie de "filme" na porção luminal do intestino delgado, impedindo por um processo "mecânico" a absorção de nutrientes.

JAYNE-WILLIAMS & HEWITT⁽³⁷⁾ e RATTRAY et al.⁽⁶⁹⁾, verificaram que o efeito tóxico das lectinas de feijões diminuía quando ensaiados em animais "germ free". Dentro desta linha, KAKADE & EVANS⁽³⁸⁾, observaram, também, que rações contendo feijões crus, quando acrescentadas de antibiótico, apresentavam um valor biológico sensivelmente mais elevado. Esses trabalhos relatados apresentam em comum a idéia de uma possível interação potenciadora

das lectinas com toxinas bacterianas ou mesmo com um aumento na proliferação dos microorganismos patogênicos.

Recentemente PUSZTAI et al.⁽⁶⁷⁾, observaram que a ingestão de feijões com teores elevados de lectinas, causava rompimento dos enterócitos do duodeno e do jejuno. O rompimento da borda estriada do duodeno foi evidenciada já uma hora após os animais terem recebido as lectinas; após uma hora e trinta minutos as mesmas lesões apareciam, também, na porção superior do jejuno. PUSZTAI acredita que a presença de altas concentrações de lectinas na dieta altera o funcionamento normal do intestino, levando as células que reagiram com as lectinas, a sofrerem um aumento na permeabilidade de sua membrana ocorrendo, desta forma, uma absorção anormal de íons, nutrientes e substâncias tóxicas, como toxinas bacterianas ou mesmo de lectinas e suas sub-frações.

Outra linha de idéias, referente ao mecanismo de ação, procura relacionar enzimas da membrana intestinal com as aglutininas. SANDHOLM & SCOTT⁽⁷¹⁾ observaram que as hidrolases pancreáticas, originalmente adsorvidas no epitélio intestinal, eram liberadas ou impedidas de ligarem-se aos enterócitos, na presença de lectinas de feijões. Por outro lado, FIGUEROA⁽²⁰⁾ e ROUINET & BESANÇÃO⁽⁷⁰⁾, observaram diminuição expressiva na atividade das dissacaridases intestinais e hipoglicemia nos animais que recebiam lectinas na ração. Esses autores sugerem a possibilidade das aglutininas se ligarem aos receptores de carboidratos, impedindo a indução de enzimas de hidrólise e de transportadores. Sugerem, ainda, a interação das lectinas com um complexo da membrana contendo maltase/invertase, que desorgani-

zado perderia sua função. FIGUEROA⁽²⁰⁾, também, apresenta a possibilidade de uma interação inespecífica das aglutininas com a membrana, desorganizando-a e levando-a a ruptura do enterócito. Promovendo assim o aparecimento de mais enterócitos jovens com - tendo menor teor de dissacaridases⁽¹²⁾. FIGUEROA⁽²⁰⁾ observou, também, que o efeito tóxico das lectinas de feijões era inversamente proporcional à quantidade de proteína na ração, sendo que as proteínas exerceriam um efeito mecânico protetor ou forneceriam à célula elementos para recuperação ou mesmo, auxiliariam no processo de renovação celular. Ainda, nessas experiências, verificou que as diferenças na toxicidade dos feijões Jalo e Rico 23, estavam mais em função da concentração do que em diferenças estruturais das lectinas como sugerido anteriormente^(25,30).

1.3 - Relação entre estrutura e ação

Poucos estudos visando conhecer as características físico-químicas e biológicas das lectinas dos feijões foram realizadas. São glicoproteínas com pesos moleculares, variando na faixa de 115.000 até 150.000⁽⁵¹⁾ e ponto iso-elétrico entre 5,0 e 6,5. Parecem ser formadas por 4 ou 8 sub-unidades, apresentando na sua constituição 4,5% ou 8,9% de carboidratos, representados por manose, glicosamina, fucose e em menores proporções xilose e arabinose. Apresentam pequena afinidade pela D galactose N-acetilada e não são seletivas para grupos sanguíneos humanos⁽⁷²⁾. São sensíveis às radiações ionizantes e ao calor quando em solu-

ção, sendo a propriedade hemaglutinante mais sensível do que a propriedade mitogênica⁽⁵⁵⁾; no grão são resistentes a doses elevadas de radiações, mesmo em teores de até 60% de umidade, mas são sensíveis ao calor, principalmente quando embebidas em água.

Através do fracionamento das proteínas de feijões, PUSZTAI et al.⁽⁶⁵⁾, verificaram que tanto as albuminas como as globulinas apresentavam atividade hemaglutinante, sendo que 10% das globulinas eram lectinas.

Trabalhando com preparações comerciais de fito-hemaglutininas, YACHNIN & SVENSON⁽⁷⁵⁾, identificaram cinco proteínas heterogêneas, cada uma formada por quatro sub-unidades; as frações de cada tetrâmero foram designadas de L ou E, em função da afinidade por leucócitos ou eritrócitos, respectivamente. A partir daí verificaram que as sub-unidades 4L e 3L-1E eram leuco-aglutinantes, enquanto as frações 4E; 3E-1L e 2E-2L eram hemaglutinantes. Cada sub-unidade tinha o mesmo peso molecular (34.000), mas ponto iso-elétrico e sequência de amino-ácidos diferentes⁽⁴⁴⁾.

Recentemente FELSTED et al.⁽¹⁹⁾, caracterizaram melhor as frações E e L; verificaram que seus pesos moleculares eram 31.700 (± 600) e 29.900 (± 200), respectivamente.

Por outro lado, PUSZTAI et al.⁽⁶⁸⁾ isolaram através de cromatografia de imuno-afinidade uma lectina formada por somente duas sub-unidades, com baixa resposta aglutinante para hemácias de coelho e alta para hemácias de rato tratadas com pronase.

Lectinas de outros vegetais foram melhor estudadas, mesmo assim, a exemplo do que ocorre com os feijões não se esta

beleceram ainda detalhes estruturais.

OLSNES et al.⁽⁶¹⁾ estudaram o mecanismo de ação das lectinas do Abrus precatorius L. e do Ricinus communis L. As lectinas da Canavalia ensiformis L.⁽⁵⁷⁾ e da Adenia digitata⁽⁶²⁾. Todas parecem ter uma ação comum inibidora de síntese protéica, a nível do ribossoma.

2 - OBJETIVOS

Considerando pesquisas anteriores em nosso laboratório, os objetivos do presente trabalho foram os de continuar estudando as lectinas dos feijões Jalo e Rico 23, para elucidar aspectos relativos à sua ação anti-nutricional, no caminho para o esclarecimento do mecanismo de ação.

Assim, procuramos inicialmente confirmar a presença de aglutininas tóxicas e não tóxicas nesses feijões. Em seguida, estudamos o efeito dessas substâncias a nível de intestino, avaliando parâmetros funcionais relativos ao crescimento, absorção de glicose "in vivo" e "in vitro", atividade de dissacaridases; procuramos também, avaliar parâmetros histológicos e imuno-enzimáticos da mucosa, bem como a participação, no mecanismo, da flora bacteriana.

3 - MATERIAIS

3.1 - Lectinas

Foram estudadas as fito-hemaglutininas extraídas e purificadas das variedades de Phaseolus vulgaris L.: Jalo e Rico 23 as quais foram selecionados e classificados na Estação Experimental de Lavras (Instituto de Pesquisas Agropecuárias do Estado de Minas Gerais). Ambas foram submetidas as mesmas condições de cultivo. Utilizou-se, também, a fito-hemaglutinina P, dos laboratórios Difco.

3.2 - Hemácias

As hemácias de coelho e de bovino foram obtidas por punção cardíaca e venosa, respectivamente, e mantidas em solução de ALSEVER⁽⁶⁾ a 4°C, até o momento do uso.

3.3 - Animais

Foram utilizados ratos Wistar (Rattus norvegicus, albinus), coelhos (Gigante-albinus) e camundongos (Albinus-Swiss), obtidos das colônias do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

3.4 - Enzimas

Foram utilizados: tripsina Difco 1:250; tripsina 2 vezes cristalizada da Worthington Biochemical Corp., U.S.A.; amilase, obtida de saliva humana, após simples centrifugação a 5.000 r.p.m./15 min ; peroxidase (horse-hadish peroxidase), Tipo VI, Sigma. Outros reagentes foram de grau p.a.

3.5 - Caseína

Caseína (Hammersten Quality, Nutritional Biochemical Corp.), foi usada nos ensaios, para avaliação da atividade do inibidor de tripsina.

3.6 - Rações experimentais

As rações experimentais foram preparadas com 10% de proteína (caseína), 8% de óleo de soja, 4% de mistura salina, 1% de mistura vitaminica, 4% de fibra e amido q.s.p. 100%, seguindo-se método padrão do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental (Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP)⁽⁴²⁾. As lectinas quando adicionadas às rações o foram às expensas do amido.

3.7 - Colunas de afinidade

No preparo das colunas de afinidade, utilizou-se tireoglobulina tipo II Sigma, brometo de cianogênio Fluka: A.G. Switzerland e Sepharose 4B Sigma.

4 - MÉTODOS

4.1 - Extração e purificação das fito-hemaglutininas

As amostras de feijão, após completamente moídas em moinho, até passarem pela peneira 0,08 mm, foram ressuspensas em solução fisiológica na razão 1:5 e agitadas por 2 horas à temperatura ambiente. Após centrifugação por 20 minutos a 5.000 r.p.m., o sobrenadante foi separado e o pH ajustado lentamente a 4,2, com HCl 0,2 N. O precipitado obtido foi descartado, o sobrenadante teve o pH ajustado a 7,0 e, em seguida, recebeu tratamento de celite-bentonite (1:1), na proporção de 10% do peso inicial da farinha de feijão (este tratamento teve como finalidade retirar o inibidor da tripsina)⁽³⁸⁾. Após uma noite de agitação, o sobrenadante foi separado e submetido à precipitação com sulfato de amônio 50-75% de saturação.

4.2 - Preparo da coluna de afinidade

A coluna de sepharose-tireoglobulina, foi preparada segundo o método de MATSUMOTO e OSAWA⁽⁵⁶⁾, através da ativação da

sepharose 4B com brometo de cianogênio e imediata incorporação da tireoglobulina.

4.3 - Obtenção do sôro imune

Coelhos adultos foram imunizados com as fito-hemaglutininas dos feijões Jalo e Rico 23 obtidas das colunas de afinidade, obedecendo ao seguinte esquema: os animais receberam inicialmente em 0,5 ml, 500 µg de fito-hemaglutininas, juntamente com 0,5 ml de adjuvante de FREUND'S completo, pela via sub-cutânea⁽⁶²⁾, seguindo-se doses sucessivas de lectinas.

Os sôros sô foram utilizados quando sangrias exploratórias mostraram títulos suficientemente elevados, o que se deu após oito semanas de imunização. Os sôros, após separação, foram adicionados de azida sódica e congelados.

4.4 - Testes imuno-enzimáticos

Os testes imuno-enzimáticos foram realizados com os sôros obtidos em 4.3, gama globulinas específicas, anti-Jalo e anti-Rico 23, foram obtidas através de fracionamento por sulfato de amônio e conjugadas com peroxidase através da ativação pelo periodato. A purificação do conjugado foi feita por cromatografia em Sephadex G-100⁽⁵⁸⁾.

A reatividade antigênica dos conjugados foi avaliada pela técnica direta do teste imuno-enzimático, denominado de ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay) baseado na técnica descrita por VOLLER et al.⁽⁷⁴⁾.

Placas plásticas de poliestireno com cavidades em U, foram utilizadas como suporte para adsorção das substâncias antigênicas. Cada cavidade foi sensibilizada por 18 horas, a 4°C, com 0,2 ml da solução de fito-hemaglutininas (contendo 40 µg/ml) isoladas dos feijões Jalo e Rico 23.

Após a sensibilização das placas, adicionou-se diluições crescentes do conjugado e estas foram incubadas em câmara úmida, durante 45 minutos, a 37°C. Após, lavaram-se as cavidades e adicionou-se o substrato para peroxidase (ácido 5-amino-salicílico com peróxido de hidrogênio). Após 1 hora em câmara úmida a 37°C, a reação foi bloqueada pela adição de NaOH 0,2 M.

As leituras das absorbâncias, do conteúdo de cada cavidade, foram feitas em espectrofotometro, em comprimento de onda de 450 nm.

Os testes imuno-imunoenzimáticos foram realizados no Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

4.5 - Imuno-precipitação em gel

A imuno-precipitação em gel foi feita com os sôros dos coelhos imunizados com as lectinas dos feijões Jalo e Rico 23. Seguindo-se a técnica descrita por CROWLE⁽¹¹⁾.

4.6 - Microscopia eletrônica

A microscopia eletrônica foi feita nos cortes dos intestinos dos ratos que receberam fito-hemaglutininas e nos respectivos controles. Foi realizada no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto.

4.7 - Transporte da glicose nos intestinos evertidos de ratos

Utilizou-se a técnica básica descrita por CRANE e WILSON⁽⁹⁾. A influência das lectinas na absorção de glicose e maltose foi estudada na presença ou ausência de gradiente de concentração. Foram estudados também os efeitos de diferentes concentrações de lectinas no meio de incubação.

4.8 - Determinação da glicose

A glicose foi determinada pelo método da GOD-POD⁽¹³⁾, utilizando-se glicose-oxidase, G.6.500 V, livre de atividade de dissacaridases e peroxidase, P 8125, tipo 1, Sigma. O-dianisidina p.a. Merck e triton X-100, Sigma.

4.9 - Determinação da atividade hemaglutinante

A dosagem da atividade hemaglutinante foi conduzida através da microtitulação com equipamento da Cole Eng. Comp. Alexander, Virginia U.S.A.

As hemácias de bovino e de coelho foram tratadas com tripsina, para aumento da sensibilidade à hemaglutinação, segundo técnica já descrita⁽⁵³⁾.

Os extratos de feijões ou as suspensões de proteínas purificadas foram diluídas em série, na razão 2, nas placas de microtitulação, utilizando-se solução fisiológica como diluente. Após a diluição adicionaram-se as hemácias e mantinha-se o sistema por 1 hora a 37°C, em estufa. Os resultados foram expressos como a última diluição que apresentava aglutinação visível.

4.10 - Atividade da anti-tripsina e da anti-amilase

A anti-tripsina e a anti-amilase foram avaliadas segundo métodos já descritos por KAKADE et al.⁽³⁹⁾ e LAJOLO⁽⁴¹⁾, respectivamente.

4.11 - Doseamento das proteínas

Utilizou-se o método de LOWRY⁽⁵²⁾, nas preparações de fito-hemaglutininas e extratos intestinais e o método de micro - Kjeldalh⁽³⁾, para avaliação do nitrogênio nas rações e nas fezes.

4.12 - Determinação de lípidos

Utilizou-se o método de extração e quantificação através do SOXLET⁽²⁶⁾, para se determinar a fração solúvel em éter.

4.13 - Determinação dos carboidratos totais

Após extração com NaOH 0,5 N os carboidratos foram determinados nas fezes de acordo com o método de BERNFELD⁽⁵⁾. O resíduo foi tratado com ácido acético 0,5 N e foi feita extração do amido com etanol 95%. Foi utilizada a amiloglicosidase na determinação do amido, seguindo a técnica descrita por AREAS e LAJOLO⁽²⁾.

4.14 - Determinação da atividade da maltase e da invertase

Foi feita na parte proximal do jejuno, segundo o método de DAHLQUIST⁽¹³⁾, usando-se tampão fosfato 0,1 M - pH 7,0 , nas preparações dos substratos.

4.15 - Inativação das fito-hemaglutininas

As lectinas foram inativadas por aquecimento em autoclave a 120°C. A efetividade do tratamento térmico foi verificada através da perda da capacidade hemaglutinante dos extratos.

4.16 - Determinação da glicose no soro

Após sangria dos animais, o sangue foi mantido a temperatura ambiente por 1 hora, deixado por 2 horas em geladeira para retração do coágulo e após centrifugação a 1.500 r.p.m. por 15 min., foi coletado. A glicose foi então determinada pelo método da glicose-oxidase já descrito.

4.17 - Eletroforese em poli-acrilamida

Eletroforeses em poli-acrilamida foram feitas, na identificação das proteínas, durante o processo de purificação das lectinas dos feijões Jalo e Rico 23, e foram conduzidas segundo a técnica de ORNSTEIN e DAVIS⁽⁶³⁾.

4.18 - Análise dos resultados

Os resultados foram analisados, tomando-se por base o desvio padrão e a análise estatística do teste "t" Student.

5 - RESULTADOS

5.1 - Caracterização das lectinas das variedades Jalo e Rico 23 quanto à aglutinação e toxicidade

A partir de trabalhos anteriores realizados por MANCINI & LAJOLO⁽⁵³⁾, LIMA et al.⁽⁵⁰⁾ e FIGUEROA⁽²⁰⁾, que caracterizaram quanto à toxicidade, diferentes cultivares de feijões, foram selecionadas as variedades Jalo e Rico 23, respectivamente "tóxica" e "não tóxica". Foi incluída, também, no ensaio a fito-hemaglutinina P Difco, com o objetivo de se trabalhar com um material padrão.

Os extratos protéicos, parcialmente purificados, foram analisados através da determinação do título aglutinante frente a hemácias tripsinizadas de bovino e de coelho. A toxicidade foi determinada através da inoculação das soluções protéicas pela via intra-peritonial em camundongos adultos (20-24g), que foram observados por 72 horas, anotando-se o número de mortos.

A Tabela 1 apresenta os resultados que caracterizam as lectinas estudadas.

Tabela 1 - Atividade aglutinante com hemácias tripisinizadas de bovino e de coelho e toxicidade das lectinas dos feijões Jalo e Rico 23 e P Difco.

Hemácias	Jalo	Rico 23	P Difco
Bovino*	1/1280	1/160	1/2560
Coelho*	1/5120	1/2560	1/2560
Proteína (mg/ml)	5,60	7,10	5,20
Toxicidade** (M/I)	6/6	0/6	4/5

*Última diluição que apresenta aglutinação visível

**Toxicidade por via intra peritoneal; (M/I) total de mortos sobre inoculados.

5.2 - Purificação das fito-hemaglutininas das variedades Jalo e Rico 23

Na Tabela 2, estão resumidos os resultados da atividade aglutinante dos extratos protéicos dos feijões Jalo e Rico 23 nas diferentes etapas da purificação. A partir dos extratos iniciais com 30 e 34 mg/ml de proteína dos feijões Jalo e Rico 23, respectivamente, chegou-se com a precipitação 50-75% de sulfato

de amônio, a soluções com 13 e 17 mg/ml de proteínas, apresentando uma purificação de aproximadamente 8 vezes.

Pode-se observar, também, na Tabela 2, que a passagem, dos precipitados protéicos, obtidos com a precipitação por sulfato de amônio, em coluna de afinidade sepharose-tireoglobulina purifica as lectinas cerca de 50 vezes. Na Figura 1, estão ilustradas as eletroforeses em poliacrilamida, das diferentes etapas; pode-se verificar que na coluna de afinidade, obteve-se uma única banda protéica com atividade específica de 1/9100 e 1/1920 para as lectinas dos feijões Jalo e Rico 23, respectivamente.

As lectinas obtidas através da coluna de afinidade não apresentaram contaminação de outros inibidores, enquanto que o precipitado protéico 50-75% de sulfato de amônio apresentou atividade residual de 5% e 60%, respectivamente, para os inibidores da tripsina e da amilase, em relação à original.

No Gráfico 1, pode-se observar o perfil de eluição e o título aglutinante, com hemácias tripsinizadas de coelho, das frações obtidas na coluna de sepharose-tireoglobulina. Partiu-se de 160 mg de proteínas, obtidas pela precipitação com sulfato de amônio, dissolvidas em solução salina tamponada 10^{-3} M, pH 7,0 . A coluna de afinidade apresentou dois picos de proteínas (com um total de 5,6 mg) e dois correspondentes com atividade aglutinante. Esses picos foram reunidos e considerados como fração resultante da coluna de afinidade.

Tabela 2 - Purificação das fito-hemaglutininas dos feijões Jalo e Rico 23

Tratamento	Jalo				Rico 23			
	Proteína mg/ml	total	Título aglutinante específico*	Purifi- cação	Proteína mg/ml	total	Título aglutinante específico*	Purifi- cação
Extrato	30,7	2.918	1/167	—	34,3	2.987	1/37	—
Precipitação pH 4.2	27,1	—	1/189	1,1	26,8	—	1/48	1,3
Celite-bentonite	18,6	1.040	1/275	1,6	21,6	1.318	1/120	3,2
Sobrenadante 50%	6,1	—	1/839	5,0	8,0	—	1/160	4,3
Sobrenadante 75%	4,0	216	1/40	—	4,6	299	1/4	—
Precipitado 50-75%	13,6	183	1/1.506	9,0	17,5	245	1/293	7,8
Sepharose-Tireoglobulina	0,7	—	1/9.100	54,0	0,5	—	1/1.920	48,0

*Atividade aglutinante sobre a quantidade de proteínas em mg

Figura 1 - Perfil eletroforético das diferentes frações isoladas durante a purificação das fito-hemaglutininas,

A - Eletrofores em pH 4,2: 1 - Extrato inicial; 2 - Após pH 4,2 ;
3 - Após celite-bentonite; 4 - Precipitado 50-75% de sulfato
de amônio e 5 - Após sepharose tireoglobulina.

B - Mesmas frações acima coradas para glicoproteínas⁽¹⁶⁾.

Gráfico 1 - Purificação das fito-hemaglutininas do feijão Jalo em coluna de afinidade (Sepharose-Tireoglobulina)

5.3 - Caracterização das fito-hemaglutininas pela imuno-precipitação em gel de ágar

Na Figura 2-A e B, estão ilustradas as respectivas bandas de precipitação dos sôros (obtidos pela imunização dos coelhos com lectinas dos feijões Rico 23 e Jalo porção central) , com as lectinas (F.H.G.): do Jalo, Rico 23 e a P. Difco.

A imuno-precipitação em gel foi realizada através do gel de 1% de ágar dissolvido em solução salina tamponada 0,003M, pH 7,0 e solidificado em vidro de relógio. Após a colocação das amostras nas cavidades, o gel foi mantido a temperatura ambiente em câmara úmida. Após 24 horas começaram a aparecer as linhas de precipitação.

Figura 2 - Imuno-precipitação em gel dos sôros imunes contra lec
tinas dos feijões Rico 23 e Jalo.

A - Cavidade central sôro anti-Rico 23; nas cavidades la
terais em 1- F.H.G. Rico 23 (1/1920)*; 2- F.H.G. Jalo
(1/9100); 3- F.H.G. P. Difco (1/500) e em 4- F.H.G.
Rico 23 (1/250).

B - Cavidade Central sôro anti-Jalo; nas cavidades late -
rais em 1- F.H.G. Jalo (1/9100)*; 2- F.H.G. Rico 23
(1/1920); 3- F.H.G. P. Difco (1/500) e em 4- F.H.G.
Jalo (1/1.100)

*Atividade aglutinante específica.

5.4 - Ensaio imuno-enzimático das fito-hemaglutininas

Com o objetivo de verificar o comportamento de outras fito-hemaglutininas frente a um soro específico, verificou-se a atividade imuno-enzimática dos sôros dos coelhos imunizados com lectinas dos feijões Jalo e Rico 23, frente as fito-hemaglutininas específicas e inespecíficas.

A Tabela 3 apresenta os resultados da densidade ótica das diluições dos conjugados dos sôros anti-Jalo e anti-Rico 23 com 4,86 e 3,10 mg/ml, respectivamente, contra 40 µg/ml das lectinas purificadas dos feijões Jalo e Rico 23 e P Difco.

O teste imuno-enzimático, também, foi feito em cortes intestinais da porção proximal do jejuno de ratos que receberam lectinas do feijão Jalo. Pode-se observar, também, reação positiva tanto para o conjugado anti-Jalo como para o anti-Rico 23.

Tabela 3 - Teste imuno-enzimático (ELISA) com as fito-hemaglutininas obtidas dos feijões Jalo e Rico 23 e P de Difco

F.H.G.	Diluições do conjugado Anti-JALO			
	10^{-3}	5×10^{-3}	10^{-4}	2×10^{-4}
Jalo	.460*	.430	.260	(.175)**
Rico	.380	.120	(.070)	.035
P.Difco	.150	(.040)	.025	.020
Testemunho	.025	.010	.010	.010

F.H.G.	Diluições do conjugado Anti-Rico 23			
	10^{-3}	5×10^{-3}	10^{-4}	2×10^{-4}
Jalo	.420	.275	.110	(.115)
Rico 23	.275	.070	(.030)	.025
P.Difco	(.045)	.020	.015	.010
Testemunho	.015	.005	.005	.005

*Leitura feita em 450 nm

**O título está indicado entre parênteses

5.5 - Efeito da associação de lectinas do feijão Rico 23 com lisados bacterianos, sobre o crescimento e dissacaridases intestinais

Nesta experiência analisamos o efeito da associação das lectinas do feijão Rico 23, quando incorporadas a rações, ao nível de 2%, juntamente com lisados bacterianos. Os lisados foram obtidos a partir de uma cultura de bactérias da flora normal de ratos em tioglicolato a qual foi submetida a ultra-som. Apresentaram uma densidade ótica igual a 0,840 em 700 nm, foram diluídos a 10^{-1} , em solução fisiológica e administrados por sonda oral, nos diferentes sub-grupos. A Tabela 4 apresenta os sub-grupos que foram formados; após onze dias de administração de rações contendo 2% de lectinas ativas e inativas, cada animal recebeu diariamente 1 ml dos lisados bacterianos, durante três dias, sendo que o grupo que recebeu, também, lectinas pela via oral, as recebeu duas horas antes. A Tabela 4, apresenta os pesos inicial e final, o consumo de ração; o coeficiente de eficácia alimentar e as atividades das dissacaridases intestinais.

Tabela 4 - Crescimento e atividade das dissacaridases intestinais de ratos que receberam rações com 2% de lectinas do feijão Rico 23, juntamente com lisados bacterianos.

Grupo	Sub-Grupo	Peso (g)		Consumo (g)	C.E.A	Atividade enzimática U/g *	
		Inicial	Final			Invertase	Maltase
F.H.G.	1-F.H.G. + lisado	67,7 [±] 9,2**	80,6 [±] 9,2	109,3 [±] 13,1	0,118 [±] 0,04	0,72 [±] 0,27 (a) **	3,29 [±] 0,96 (a)
	2-lisado	68,9 [±] 11,0	78,2 [±] 3,6	110,4 [±] 9,2	0,084 [±] 0,09	0,51 [±] 0,12 (a)	2,39 [±] 0,50 (a)
F.H.G. inativa	3-lisado	68,7 [±] 5,6	85,5 [±] 4,7	111,2 [±] 6,3	0,151 [±] 0,03	1,94 [±] 0,35 (b)	7,31 [±] 0,90 (b)

* A atividade enzimática foi expressa como unidades por grama de tecido

**[±] desvio padrão

C.E.A. - Sub-grupos 1 e 2 iguais

(a)≠(b) p= 0,01

5.6 - Efeito da ingestão das fito-hemaglutininas sobre a digestibilidade aparente de proteínas, glícides e lípidos

A partir de quatro grupos de seis ratos com peso médio de 120 gramas, estudou-se o efeito da administração, por sonda gástrica, das fito-hemaglutininas do feijão Jalo (43 mg/ml, com atividade específica igual a 1/1.000) sobre a digestibilidade das proteínas, glícides e lípidos. Na Tabela 5, são apresentados os resultados das determinações dos nutrientes na ração e nas fezes, no quarto dia da experiência. Após sete dias os animais foram sacrificados e as dissacaridases intestinais: maltase e invertase, foram determinadas nos quatro grupos experimentais.

Os carboidratos representam a somatória das determinações nas fezes antes e após hidrólise. Não foram determinados os desvios-padrão, pois os resultados foram obtidos por grupo, após coleta e mistura das fezes e não individualmente em cada animal.

Tabela 5 - Digestibilidade de proteínas, glícides, lípides e atividade das dissacaridasas intestinais em ratos que receberam lectinas do feijão Jalo por sonda gástrica*.

Grupo	Ração				Fezes				Atividade Dissacaridasas**	
	Consumo	Proteínas	Carboi- dratos	Lípides	Quantidade	Proteínas	Carboi- dratos	Lípides	U/mg . proteína x 10 ⁻²	
	g	mg	mg	mg	g	mg	mg	mg	Maltase	Invertase
F.H.G. "ad libitum"	8,9	981	670	642	0,90	274	20,3	23,7	3,6 [±] 1,1(a)	0,5 [±] 0,1(a)
F.H.G. inativa **** "par alimentado"	9,0	990	684	648	0,47	136	13,1	2,6	9,5 [±] 0,6(b)	1,4 [±] 0,1(b)
F.H.G. inativa "ad libitum"	10,6	1166	800	763	0,67	119	17,0	7,7	9,3 [±] 0,6(c)	1,5 [±] 0,1(c)
Controle "ad libitum"	11,3	1242	860	813	0,55	150	16,8	2,9	8,1 [±] 0,7(d)	1,0 [±] 0,1(d)

* 43 mg/ml, sendo 1 ml/100g de rato

** Após 7+ dia, (a)≠(b) p=0,001; (a)≠(c) p=0,01; (a)≠(d) p=0,05

*** ± desvio padrão

**** com o grupo FHG

Obs. - O crescimento dos grupos F.H.G. e F.H.G. inativa "par alimentado" foram iguais.

5.7 - Efeito das fito-hemaglutininas sobre a absorção intestinal de glicose (ensaio agudo)

A Tabela 6, apresenta os resultados referentes à glicose no sêro dos grupos que receberam fito-hemaglutininas padrão Difco (4 mg/ml), atividade específica igual a 1/500, ativa e inativa, após 30 e 60 minutos de administração por sonda gástrica juntamente com 100 mg de glicose por ml. Os ratos utilizados pesavam aproximadamente 160 gramas e foram previamente mantidos em jejum por 24 horas.

Na Tabela 6, estão também os resultados obtidos por FIGUEROA⁽²⁰⁾ em nosso laboratório, que verificou a influência das lectinas do Rico 23 (50 mg/ml) sobre a glicemia, na presença de 100 mg de amido por ml.

Tabela 6 - Glicemia em ratos após a administração de fito-hemaglutininas P. Difco e glicose (ensaio agudo)

Grupo	Tempo (min.)	Glicose soro mg%			
		P. Difco		Rico 23 (20)	
F.H.G.	30	113,0	± 10,6*	67,0	± 10,0 ^(c)
F.H.G.** (inativa)	30	102,5	± 10,1	—	
F.H.G.	60	100,5	± 10,0 ^(b)	53,0	± 9,0 ^(d)
F.H.G.** (inativa)	60	120,6	± 11,0 ^(a)	74,0	± 8,0 ^(c)
Controle (jejum)	—	63,8	± 8,0	66,0	± 8,0 ^(c)

* ± desvio padrão

** fito-hemaglutininas aquecidas, atividade residual igual a zero

(a) ≠ (b) e (c) ≠ (d) ($P \leq 0,05$)

5.8 - Microscopia eletrônica dos intestinos dos ratos submetidos ao consumo de rações contendo 1% de fito-hemaglutininas obtidas do feijão Jalo

Para o desenvolvimento dessas experiências foram formados três grupos de quatro animais, com peso médio inicial de 96 gramas, sendo que um grupo recebeu ração com 1% de lectina do Jalo (com atividade específica igual a 1/1.000); um grupo foi "paralimentado" de acordo com grupo anterior e um grupo alimentado "ad libitum". Os animais receberam este tipo de tratamento durante cinco dias, após os quais, foram sacrificados e seus intestinos retirados para o estudo dos enterócitos através da microscopia eletrônica.

A Tabela 7, mostra os pesos dos três grupos, bem como, o consumo de ração contendo 10% de caseína durante a experiência.

A microscopia eletrônica foi feita no terço médio do jejuno. As Figuras 3, 4 e 5 apresentam as micrografias eletrônicas dos grupos em estudo.

Tabela 7 - Crescimento e consumo de ração dos ratos submetidos à ingestão de fito-hemaglutininas do feijão Jalo para a realização da microscopia eletrônica.

Grupo	Pesos (g)		Consumo de ração (g)/dia**
	Inicial	Final	
"par alimentado"	95,5 $\pm$ 4,6*	93,5 $\pm$ 6,9	4,2
F.H.G.	96,0 $\pm$ 2,6	91,0 $\pm$ 1,6	4,2 $\pm$ 0,4
"ad libitum"	96,2 $\pm$ 2,6	109,7 $\pm$ 2,5	11,6 $\pm$ 2,7

* $\pm$ desvio padrão

** por 5 dias

Figura 3 - Micrografias eletrônicas dos intestinos do grupo que recebeu fito-hemaglutininas e dos respectivos controles.

a - Microvilosidades normais (9.600x) grupo controle "ad libitum"

b - Microvilosidades normais (9.600x) do grupo controle pareado

c - Microvilosidades curtas, algumas bifurcadas (9.600x) do grupo experimental (ração com 1% de lectinas do Jalo.

Figura 4 - Micrografias eletrônicas dos intestinos que receberam fito-hemaglutininas.

a - Microvilosidades diminuídas e curtas (9.600x)

b - Microvilosidades separadas por trechos sem microvilosidades (16.500x)

c - Alteração na base de implantação das microvilosidades (16.500x)

Figura 5 - Alterações das estruturas incluídas nos enterócitos do grupo que recebeu fito-hemaglutininas

a e b - Grandes autofagosomas no citoplasma supranuclear de células epiteliais do terço médio jejunal.

a - (14.250x)

b - (25.000x)

5,9 - Efeito das aglutininas na absorção de glicose "in vitro"

Essas experiências foram conduzidas com intestinos evertidos de ratos adultos (peso médio de 200 gramas). Os animais foram sacrificados por fratura do crânio seguida de sangria pela jugular. Após o sacrifício, procedeu-se à abertura do abdômen na porção mediana longitudinal; exposto o intestino, retirou-se o mesentério e promoveu-se o corte a partir do duodeno. O intestino foi colocado em solução de Krebs-Henseleit modificada⁽¹⁴⁾, em um vidro de relógio, previamente tarado, pesado, promovendo-se em seguida a eversão do mesmo através de um fio de aço inoxidável. O fragmento do jejuno, medindo aproximadamente 10 cm, ligado em uma das extremidades, foi fixado através da outra em uma canula de vidro, pela qual eram retiradas amostras em tempos diferentes. SILVA⁽⁷³⁾ apresenta o diagrama do sistema utilizado e gentilmente nos forneceu um modelo.

Os intestinos durante o processo de absorção intesti-nal eram mantidos em solução de Krebs-Henseleit borbulhando-se mistura carbogênica ($\text{CO}_2:\text{O}_2::5:95$).

Os animais receberam duas doses de lectinas do feijão Jalo (fração precipitada em 50-75% de sulfato de amônio), 16 e 3 horas antes da experiência. As doses continham 30 mg/ml de proteína e eram de 1ml/100g de peso.

No final de cada experiência determinou-se, nos extra - tos intestinais, a atividade da maltase e da invertase, os resultados apresentam-se expressos em unidades de atividade por mg de proteína vezes 10^{-2} .

Esses estudos foram conduzidos em quatro situações:

- 1) Concentrações diferentes de glicose, a partir de uma solu
ção 30 mM de glicose.
- 2) Concentrações iguais de glicose, 20 mM de glico -
se no lado mucoso e no lado seroso.
- 3) A partir de solução 10 mM de maltose sō no lado mucoso.
- 4) Em diferentes concentrações de fito-hemaglutininas ensaiaa
das diretamente com os intestinos e maltose ou glicose ,
apōs a eversão.

Amostras de 0,02 ml foram retiradas em tempos diferentes
atē 60 minutos do inīcio da absorção. Determinou-se a glicose
nas amostras atravēs do mētodo da glicose-oxidase jã descrito
anteriormente.

Seguem-se nas Tabelas 8, 9 e 10, os resultados do efeito
das fito-hemaglutininas na absorção de glicose "in vitro".

Tabela 8 - Efeito de fito-hemaglutininas na absorção da glicose "in vitro". 1º) Concentrações diferentes de glicose, no lado mucoso (30 mM) e no lado seroso (sem glicose)

Tempo (minutos)	Glicose $\mu\text{g/ml}$ no lado seroso		p
	F.H.G.	Controle	
0	17,24 $\pm$ 4,15**	11,49 $\pm$ 3,39	—
10	53,39 $\pm$ 7,30	102,15 $\pm$ 10,11	—
20	126,23 $\pm$ 11,23	293,91 $\pm$ 17,14	—
30	220,52 $\pm$ 14,85	828,69 $\pm$ 28,78	0,001
40	356,49 $\pm$ 18,88	1453,44 $\pm$ 37,60	0,001
50	502,43 $\pm$ 22,41	2377,67 $\pm$ 48,76	0,001
Maltase*	1,20 $\pm$ 0,50	14,42 $\pm$ 2,20	0,001
Invertase	0,44 $\pm$ 0,30	2,93 $\pm$ 1,04	0,001

* Atividade das dissacaridases em U/mg de proteína $\times 10^{-2}$

** $\pm$ desvio padrão

Tabela 9 - Efeito das fito-hemaglutininas na absorção de glicose "in vitro". 2º) Concentração de glicose do lado mucoso igual a do lado seroso. (20 mM).

Tempo (minutos)	Glicose $\mu\text{g/ml}$ no lado seroso		p
	F.H.G.	Controle	
0	4043,75 $\pm$ 280,55**	4166,33 $\pm$ 255,32	—
10	4005,75 $\pm$ 190,15	4223,00 $\pm$ 171,89	—
20	3894,00 $\pm$ 478,72	4937,00 $\pm$ 480,42	0,02
30	3965,50 $\pm$ 204,32	5545,33 $\pm$ 771,79	0,01
40	3932,00 $\pm$ 355,77	5774,33 $\pm$ 307,15	0,001
50	4015,75 $\pm$ 695,93	6382,00 $\pm$ 698,52	0,002
Maltase*	0,85 $\pm$ 0,60	7,06 $\pm$ 2,90	0,002
Invertase	0,39 $\pm$ 0,26	1,99 $\pm$ 0,23	0,001

* Atividade das dissacaridases em U/mg de proteína $\times 10^{-2}$

** $\pm$ desvio padrão

Tabela 10 - Efeito das fito-hemaglutininas na absorção de glicose "in vitro". 39) A partir de maltose no lado mucoso (10mM).

Tempo (minutos)	Glicose $\mu\text{g/ml}$ no lado seroso		p
	F.H.G.	Controle	
0	35,27 $\pm$ 0,11**	35,29 $\pm$ 24,97	—
10	41,17 $\pm$ 20,27	75,88 $\pm$ 52,27	—
35	94,16 $\pm$ 44,72	382,77 $\pm$ 83,93	0,001
60	141,34 $\pm$ 107,95	1001,25 $\pm$ 351,84	0,001
Maltase*	1,50 $\pm$ 0,20	9,20 $\pm$ 0,70	0,001
Invertase	0,25 $\pm$ 0,11	1,76 $\pm$ 0,30	0,001

*Atividade das dissacaridasas em U/mg de proteína $\times 10^{-2}$

** $\pm$ desvio padrão

6 - DISCUSSÃO

As variedades Jalo e Rico 23 foram escolhidas por terem sido o objeto de estudo anterior em nosso Departamento. Assim, LAJOLO⁽⁴¹⁾, isolou o inibidor da amilase do Rico 23; MANCINI e LAJOLO⁽⁵³⁾, trabalharam com quinze variedades brasileiras de feijões, dentre elas Jalo e Rico 23, na caracterização das fito-hemaglutininas frente a diferentes tipos de hemácias e na quantificação dos inibidores enzimáticos e MANCINI, SERVOS e LAJOLO⁽⁵⁴⁾, detectaram a presença de inibidor de amilase em preparações comerciais de fito-hemaglutininas (F.H.G. M e P). MANCINI, VIZEU e LAJOLO⁽⁵⁵⁾, estudaram o efeito das radiações ionizantes sobre a capacidade aglutinante e mitogênica da fito-hemaglutinina P Difco. Ainda, em nossos laboratórios LIMA et al.⁽⁵⁰⁾, estudaram a toxicidade, mitogênese e aglutinação das variedades Jalo e Rico 23, entre outras e, finalmente, FIGUEROA⁽²⁰⁾, trabalhou com as lectinas das variedades Jalo e Rico 23, investigando o seu efeito sobre as dissacaridases intestinais, interferência no crescimento, digestibilidade e glicemia de ratos; estudou, ainda, o papel da concentração protéica na severidade da manifestação tóxica de suas lectinas.

Dentro desse espírito as investigações conduzidas por nós tiveram como objetivo fornecer mais informações sobre os as-

pectos toxicológicos que envolvem o comportamento das fito-hemaglutininas.

A caracterização das lectinas dos feijões Jalo, Rico 23 e da fito-hemaglutinina P Difco (Tabela 1), leva inicialmente concluir pela existência de aglutininas "tóxicas": as do Jalo e a F.H.G. P, ambas com atividade aglutinante elevada frente a hemácias de bovino, correlação já relatada por JAFFÉ e outros autores^(30,50) e, outras "não tóxicas" como as do Rico 23, com baixa atividade aglutinante para essas hemácias.

A classificação em "tóxica" e "não tóxica", porém, parece não ser totalmente adequada. Já, FIGUEROA⁽²⁰⁾ observava em seu trabalho que quando as aglutininas isoladas dos feijões Jalo e Rico 23 eram dadas a animais em atividades equivalentes o efeito sobre crescimento, glicemia e dissacaridases intestinais era semelhante. Provavelmente o ensaio de feijão não fornece o mesmo resultado que o da aglutinina isolada. Além disso, o ensaio de toxicidade por via intra-peritoneal de extratos protéicos, como costuma ser efetuado,^(33,50) parece impróprio já que outros componentes podem ser veiculados.

A Tabela 2, apresenta os resultados da purificação das lectinas do Jalo e do Rico 23, podendo-se observar que a passagem dos extratos obtidos pela precipitação 50-75% de sulfato de amônio, em coluna de afinidade sepharose-tireoglobulina (Gráfico 1), purifica as lectinas 50 vezes e até a homogeneidade como pode ser vista nas eletroforeses destas preparações com uma única banda protéica. Pelas eletroforeses em diferentes etapas de purificação (Figura 1) verificam-se, também, bandas de mesma mobilidade para as lectinas de ambos os feijões. Esta observação concor

da com a de FIGUEROA⁽²⁰⁾, que não identificou entre as lectinas do Jalo e do Rico 23 diferença de ação desde que ensaiadas em concentrações equivalentes, reforçando a idéia de identidades moleculares e efeitos biológicos próximos.

Finalmente pela imuno-precipitação em gel das fito-hemaglutininas dos feijões Jalo, Rico 23 e F.H.G. P, contra os sôros imunes das lectinas Jalo e Rico 23, observa-se (Figura 2A e 2B) que todas apresentam o mesmo componente antigênico, pois, as linhas de precipitação são semelhantes para as três lectinas. O teste imuno-enzimático, apresenta, também, os mesmos resultados com relação à reação positiva para os anti-sôros inespecíficos, dando condições, inclusive, de quantificá-los. Na Tabela 3, pode-se verificar que o conjugado anti-Jalo reage com as lectinas do Jalo ou do Rico 23 em diluições semelhantes, apresenta também reação positiva para fito-hemaglutinina P. Por sua vez o conjugado anti-Rico 23 apresenta-se positivo para as aglutininas do Jalo, do Rico 23 e, também, da P. Difco. Esta propriedade imunológica das lectinas fala novamente em favor da semelhança estrutural, independente da variedade de feijão que provem.

Reações positivas de anti-sôros inespecíficos, também, foram observadas em cortes histológicos de intestinos, onde houve reação de ELISA positiva ao nível do tecido epitelial, nos intestinos de ratos que receberam lectinas do feijão Jalo. Neste aspecto, além, da reação positiva para o conjugado anti-Rico 23, é importante caracterizar a possibilidade da identificação das lectinas ligadas ao epitélio intestinal, sendo essa, eventualmente, a primeira etapa do processo toxicológico.

Esses resultados, novamente, somam-se aos já descritos e

aos de FIGUEROA⁽²⁰⁾, na indicação de fito-hemaglutininas semelhantes para as variedades Jalo e Rico 23 e na impropriedade da classificação proposta para as lectinas de diversos feijões.

Ainda dentro do processo de absorção intestinal e visando correlacionar a participação de substâncias presentes no lumen e a toxicidade das lectinas, estudamos o efeito das toxinas bacterianas, da flora intestinal normal, sobre o aproveitamento biológico de rações.

Essas experiências foram programadas com base nos trabalhos de RATTRAY et al.⁽⁶⁹⁾, JAYNE-WILLIAMS & HEWITT⁽³⁷⁾ e KORTE⁽⁴⁰⁾.

RATTRAY et al.⁽⁶⁹⁾, observaram que dietas contendo feijões crus, quando fornecidas para ratos gnotobióticos, causavam um aumento da utilização líquida da proteína (N.P.U.) de quatro vezes com relação as mesmas dietas fornecidas a animais convencionais. Os autores apresentaram como possível mecanismo a participação da flora bacteriana na transformação ou potencialização das lectinas presentes nos feijões. Da mesma forma JAYNE-WILLIAMS e HEWITT⁽³⁷⁾, observaram que o feijão cru não era letal quando fornecido a codornas livres de germes. Estudaram a combinação de diversas culturas bacterianas com dietas contendo feijão cru e verificaram que a Escherichia coli tipo I era a responsável pelo efeito letal. Essa bactéria produz uma enterotoxina⁽²²⁾, capaz de ativar a adenil ciclase das células do intestino delgado, promovendo a perda de líquido e provocando, desta forma, diarreia. Aqui cabe comentar as observações feitas por KORTE⁽⁴⁰⁾, que verificou alta incidência de diarreia em crianças que se alimentaram de feijões crus ou feijões que foram submetidos a um cozimento insu-

ficiente.

PUSZTAI et al.⁽⁶⁶⁾ sugerem, também, que após a lesão dos enterócitos, a qual pode chegar inclusive ao rompimento, poderia ocorrer penetração de bactérias ou de toxinas ou mesmo de aglutininas na célula, atingindo a corrente circulatória e promovendo, de tal forma uma toxinfecção letal.

Os nossos resultados (Tabela 4) com lisados bacterianos não confirmam as observações feitas por outros autores, apesar de que, esses lisados não foram dosados, isto é não foram feitas identificações quantitativas ou qualitativas dos microrganismos presentes. Sabe-se porém que a Escherichia coli representa uma porcentagem elevada das bactérias intestinais.

Mais estudos deverão ser feitos, visando esclarecer a eventual participação das toxinas bacterianas e mesmo das bactérias, juntamente com as lectinas, no processo de intoxicação dos organismos animais.

Em vista do crescimento retardado dos animais que ingeriram as aglutininas, tentamos identificar um eventual bloqueio no aproveitamento de nutrientes. Estudamos, assim, o efeito das fito-hemaglutininas, administradas por sonda gástrica, sobre a digestibilidade de proteínas, carboidratos e lípidos presentes em uma ração experimental. Pela Tabela 5, pode-se verificar que não houve alteração aparente no aproveitamento de carboidratos e lípidos, nos quatro grupos estudados. As análises destas substâncias nas fezes correspondem ao quarto dia, onde a diferença no teor de lípidos observada, no grupo que recebeu lectina (23,7 mg) não apresenta significância, se considerarmos a quantidade total ingerida (642 mg). No entanto, o teor protéico nas fezes dos

animais do grupo que recebeu lectinas é superior ao dos animais controle, inclusive no grupo "par alimentado"; este fato adquire importância principalmente por se estar trabalhando com quantidades reduzidas de proteínas e a perda de aproximadamente 270 mg nas fezes, parece significativa apesar de não se terem observado diferenças de peso, entre os grupos, durante os quatro dias iniciais. A proteína eliminada nas fezes, pode ser a proteína da dieta ou a proteína endógena, isto é, aquela resultante da descamação do epitélio ou mesmo proteína de enzimas digestivas. JAFFÉ et al.⁽³⁵⁾, também observaram redução na digestibilidade de proteínas (e também dos lípidos) quando acrescentavam feijão cru à dieta.

Ainda nessa experiência (Tabela 5) observamos que as atividades das dissacaridases intestinais (maltase e invertase), apresentavam-se alteradas no grupo que recebeu lectinas com redução na atividade de quase três vezes frente ao grupo "par alimentado". É oportuno salientar que a inclusão desse grupo controle adquire importância nas experiências pois as lectinas levam a uma redução no consumo de ração; em nossa experiência, por exemplo, a diminuição da ingestão foi da ordem de 15 a 20%. Essa redução é ainda maior, chegando a até 60% dos controles, quando as lectinas não são dadas por sonda mas estão incorporadas à ração.

A observada diminuição na atividade das dissacaridases não teve como consequência um aumento dos carboidratos intestinais como esperavamos. É possível que mesmo com os controles do grupo "par alimentado", a influência da flora bacteriana tenha parcialmente mascarado os resultados.

Pudemos, porém, confirmar o efeito previsto através da

avaliação da glicemia em ratos submetidos à ingestão de lectinas mais dose de glicose por sonda gástrica.

O efeito das lectinas sobre a absorção de glicose, foi estudado através do "ensaio agudo" em ratos. As determinações de glicose no soro correspondem aos tempos de 30 e 60 minutos, após a administração da fito.hemaglutinina P. Como se pode observar pelos dados (Tabela 6), apenas após decorridos 60 minutos é que se pode verificar diferença ($p = 0,05$), fato que foi tomado como indicação de eventuais alterações no processo de absorção a nível de mucosa. Os nossos resultados são semelhantes aos de FIGUEROA⁽²⁰⁾, mantendo-se as devidas proporções em função do carboidrato utilizado (Tabela 6).

Os nossos resultados, também, se assemelham aos de JAFFÉ e CAMEJO⁽³¹⁾, que observaram alterações no processo de absorção de glicose em alças isoladas de intestinos de ratos que consumiram lectinas de feijões.

Através da microscopia eletrônica pudemos confirmar nossa hipótese inicial da existência de alterações nos enterócitos, indicadas pelos resultados da velocidade de absorção da glicose e das mudanças das dissacaridases intestinais nos ensaios "in vivo".

As micrografias eletrônicas como descrito em materiais e métodos correspondem a animais submetidos por cinco dias à ação das lectinas tendo-se o cuidado de incluir um grupo "par-alimentado" para corrigir e interpretar possíveis efeitos que viessem a ser devidos apenas a diferenças de ingestão de ração (Tabelas 5 e 7).

A Figura 3, apresenta as micrografias eletrônicas das

células epiteliais do terço médio de vilosidade jejunal, com aumento de 9.600x; em 3a observam-se as microvilosidades dos controles; em 3b as microvilosidades dos controles pareados e em 3c as dos animais que receberam lectinas, onde se podem ver o encurtamento, bifurcação e espaçamento das microvilosidades.

A Figura 4, mostra o terço médio da porção jejunal dos animais que receberam lectinas, podendo-se ver em 4a o encurtamento e diminuição no número das microvilosidades; em 4b as microvilosidades apresentam-se curtas e esparsas, separadas por trechos em vilosidades e, em 4c, grupos de duas ou três microvilosidades, dividem uma base comum de implantação.

Na Figura 5, podemos observar grandes autofagosomas no citoplasma supranuclear de células epiteliais, no terço médio jejunal dos grupo que recebeu lectinas. É evidente, também, a condensação do citoplasma, bem como a degradação das estruturas incluídas.

Pelas micrografias eletrônicas não se verifica qualquer alteração nos enterócitos dos grupos controle 3c e controle pareado 3a, que poderiam apresentar alguma anomalia em virtude do diferente consumo de ração, apesar do período relativamente curto (cinco dias) da experiência. No entanto, os enterócitos dos animais que consumiram lectinas, apresentam-se seriamente danificados provando que o efeito observado não é devido a uma diferença no consumo de ração.

BRUNSER et al.⁽⁸⁾, verificaram que o marasmo pode promover modificações na morfologia da mucosa jejunal, provocando o encurtamento e o espaçamento das microvilosidades. Observaram,

também, o aparecimento de autofagosomas e degradação das estruturas incluídas.

Essas alterações dos enterócitos costumam ser atribuídas à menor disponibilidade proteica do organismo⁽⁸⁾, à qual provoca diminuição da síntese proteica e redução da capacidade de proliferação das células intestinais. É oportuno salientar que para manutenção da sua integridade morfológica e funcional o intestino apresenta elevada velocidade de multiplicação, migração e exfoliação das células epiteliais⁽¹⁰⁾.

As alterações por nós observadas, de hipotrofia da mucosa jejunal com achatamento e espaçamento das microvilosidades, bem como o aparecimento de autofagosomas, são semelhantes às verificadas por BRUNSER et al.⁽⁸⁾, na desnutrição proteica.

Ainda dentro de um quadro comparativo e visando compreender as modificações induzidas pelas lectinas, vale salientar as mudanças nos enterócitos, provocadas por bloqueadores químicos da síntese proteica; LECOUNT e GREY⁽⁴⁵⁾, por exemplo, verificaram que a cicloheximida provoca encurtamento e espaçamento das microvilosidades dos enterócitos de galinha, alterações semelhantes às observadas na desnutrição proteica. Observou-se, também, diminuição na atividade de enzimas intestinais. GONZALEZ et al.⁽²⁴⁾ e BERKEL et al.⁽⁴⁾, detectaram diminuição na atividade da lactase e da invertase em crianças desnutridas.

Pelos nossos resultados, observa-se diminuição na atividade das dissacaridases intestinais, semelhante àquela encontrada por FIGUEROA⁽²⁰⁾ e ROUANET e BESANÇON⁽⁷⁰⁾. Verificam-se, ainda, alterações da morfologia do terço médio da porção jejunal dos intestinos dos animais que receberam lectinas. Esse quadro

patológico dos enterócitos, difere daquele observado por PUSZTAI et al.⁽⁶⁶⁾, que trabalhando, também, com lectinas de feijões observaram o rompimento das microvilosidades dos enterócitos.

A capacidade da renovação das estruturas celulares do tecido epitelial do intestino delgado é bastante alta. JAMES et al.⁽³⁶⁾, observaram em ratos que a meia vida da bordadura em escova é de 18 horas, e é caracterizada pela maturação e migração das células epiteliais da cripta para extremidade. Nas criptas ocorrem as divisões celulares que projetam as células em direção a luz intestinal. No topo das vilosidades ocorrem as descamações das células para o lúmen⁽¹⁰⁾.

A maltase ^e a invertase são sintetizadas e catabolizadas durante a migração das células do epitélio intestinal, podendo, neste processo, através de outros fatores, ocorrer estímulo ou bloqueio na síntese dessas enzimas⁽¹⁵⁾. JAMES et al.⁽³⁶⁾ sugerem, também, a possibilidade de modificação da síntese e catabolismo das dissacaridases mesmo nas células maduras.

OLSNES et al.⁽⁶¹⁾ estudando o mecanismo da ação tóxica das lectinas abrina (Abrus precatorius L.- Leguminosa) e ricina (Ricinus communis L. - Euforbiacea), observaram que essas proteínas eram resistentes às enzimas digestivas e formadas por duas cadeias protéicas com peso molecular entre 30.000 e 35.000. Verificaram que uma das frações (haptômero) era a responsável pelo acoplamento da lectina à membrana celular, enquanto a outra (efetômero), penetrava no citoplasma através da endocitose, atuando sobre os ribossomos e promovendo o bloqueio da síntese protéica. Observaram, também, que o acoplamento da lectina à célula era imediato, mas a penetração exigia um determinado espaço de tem-

po (lag), dependente da temperatura; 30'/37°C e 6 horas/20°C.

Existem outras lectinas que apresentam, também, como mecanismo de ação o bloqueio da síntese protéica, como é o caso da modicina⁽⁶²⁾, obtida da Adenia digitata L., proteína com peso molecular ao redor de 63.000, formada por duas sub-unidades. Apresenta alta letalidade quando injetada intra-peritonalmente em camundongos ou ratos. A Concanavalina A (obtida da Canavalia ensiformis L.) é outro exemplo de lectina, que promove o bloqueio da síntese protéica, quando presente em culturas celulares (BHK 21/C13). Inicialmente, pensou-se que a concanavalina competia com a insulina, fator estimulador do crescimento de células, por um receptor comum, no entanto, MOSER et al.⁽⁵⁷⁾, demonstraram que esta lectina na verdade induz a diminuição da síntese protéica das células.

ETZER⁽¹⁷⁾, usando as lectinas marcadas pelo isotiocianato de fluoresceína, isolou e quantificou receptores para ricina e abrina da superfície das células da cripta do epitélio intestinal de ratos. Através dos ensaios imuno-enzimáticos (ELISA) em cortes de intestinos os nossos resultados mostraram, também, a presença de lectinas junto às células epiteliais.

A afinidade das lectinas por resíduos de açúcares da mucosa intestinal tem sido caracterizada como a responsável pela reação de acoplamento. Assim a ricina e a abrina apresentam afinidade por B-D-galactose; as lectinas dos feijões (Phaseolus vulgaris) se ligam à D-galactose N-acetilada; a modicina reage com resíduos de lactose de polissacarídeos e glicoproteínas, enquanto a concanavalina A é inibida pela α metil-D-manose.

Ainda, procurando dar continuidade às nossas observações, com o objetivo de tentar identificar a participação das

lectinas no processo de absorção intestinal, realizamos algumas experiências "in vitro" com intestinos evertidos de ratos, empregando a técnica de CRANE e WILSON⁽⁹⁾. Essa técnica apesar de ser criticável em alguns aspectos, como por exemplo: a exposição do intestino ao meio e que após o corte pode influenciar na ligação de substâncias e no consumo de oxigênio⁽⁴⁶⁾, apresenta, diversas vantagens: promove diferenças na concentração de glicose, é executada em pequenos volumes de líquido e evita diferenças, como fluxo sanguíneo, metabolismo do organismo e mesmo a flora bacteriana intestinal.

Tomando por base a meia vida dos enterócitos⁽³⁶⁾ e a fase lag para penetração do efetômero das lectinas abrina e ricina, e, ainda, considerando um determinado período para eliminação do conteúdo intestinal e após algumas observações práticas, foi estabelecido o esquema experimental utilizado. Trabalhou-se com duas doses de fito-hemaglutininas dadas por sonda estomacal, uma 16 e a outra 3 horas antes da realização do ensaio "in vitro".

Pode-se observar (Tabela 8) que já a partir de 30 minutos, há diferença na absorção de glicose, sendo os teores no lado seroso (interno, após eversão) inferiores aos dos respectivos controles. O Gráfico 2, ilustra essas diferenças pelas inclinações das curvas de absorção de glicose no espaço de 50 minutos. Observaram-se, também, diferenças nas atividades da invertase e da maltase intestinais. Esta experiência foi feita em concentrações diferentes de glicose no compartimento da mucosa.

Na Tabela 9, estão os resultados das experiências realizadas contra gradiente de concentrações, onde pode-se visualizar que a partir de valores iniciais ao redor de 4,0 mg/ml de

Gráfico 2 - Efeito das lectinas na absorção de glicose "in vitro".

19) Concentrações diferentes de glicose, no lado mucoso (30 mM) e no lado seroso sem glicose.

glicose chega-se a 6,38 mg/ml após 50 minutos, nos intestinos controles. Nos intestinos dos ratos que receberam fito-hemaglutininas não se verifica diferença na concentração de glicose no lado seroso. O Gráfico 3, apresenta as curvas de absorção de glicose dos dois grupos. Do mesmo modo que na experiência anterior, as atividades das dissacaridases intestinais estão sensivelmente diminuídas, ($p = 0,002$) para a maltase e para invertase ($p = 0,001$), quando comparadas com o controle.

Ainda, dentro do objetivo de verificar a participação das lectinas, no processo de digestão e transporte de açúcares, verifica-se na Tabela 10, a diferença na absorção de glicose a partir de maltose. O Gráfico 4, ilustra os resultados obtidos. As atividades das dissacaridases intestinais, também, alteradas estão apresentadas na Tabela 10.

Nas experiências feitas com intestinos evertidos observou-se diminuição significativa na velocidade de absorção de glicose e, também, diminuição na atividade da maltase e da invertase causadas pela ingestão de lectinas. É oportuno lembrar que não se observou variação significativa no peso dos intestinos antes e após da medida de absorção de glicose, fato que se ocorresse poderia provocar diferenças no movimento de líquido acarretando modificação na absorção de glicose não devida às lectinas. Observamos, também, que para essa ação as lectinas devem ser dadas aos animais com antecedência; a incubação direta do intestino isolado mais lectina (ensaiada após 30 e 60 minutos) não resultou em qualquer modificação na velocidade de absorção de maltose ou na atividade da maltase.

Em função dos resultados apresentados podemos explicar

Gráfico 3 - Efeito das lectinas na absorção de glicose "in vitro".

2º) Mesma concentração inicial de glicose (20 mM)

"transporte contra gradiente de concentração".

Gráfico 4 - Efeito das lectinas na absorção de glicose "in vitro".
3º) A partir de maltose (10mM) no lado mucoso,

o efeito anti-nutricional das lectinas dentro das seguintes possibilidades:

- 1 - Efeito primário - As lectinas (de forma semelhante à ciclo-heximida) penetrariam nas células e atuando sobre os ribossomas, levariam ao bloqueio da síntese protéica provocando, como consequência: diminuição das dissacaridases e glicemia, alterações da morfologia das células epiteliais do intestino.
- 2 - Efeito direto - As lectinas poderiam provocar a desnutrição dos animais através do impedimento na utilização das proteínas, causando, com isto, menor absorção de amino-ácidos resultando em perda de peso, diminuição das dissacaridases e glicemia, além de alterações morfológicas no epitélio intestinal (incapacidade de recuperação).

Provavelmente ambos os efeitos podem ocorrer resultando nas alterações observadas em nossas experiências. Estudos para confirmar essas hipóteses já estão em elaboração em nosso Departamento.

7 - CONCLUSÕES

As lectinas dos feijões Jalo e Rico 23 apresentam da mesma forma que a fito-hemaglutinina P Difco um mesmo componente antigênico identificável pela imuno-precipitação em gel e pelo teste de "ELISA" o que sugere similaridade da estrutura e de ação.

Essas substâncias são capazes de se ligarem ao epitélio intestinal e causar redução: no crescimento, na digestibilidade de proteínas e na atividade da maltase e invertase intestinais. Além disso, causam alterações morfológicas a nível do epitélio, demonstráveis pela microscopia eletrônica, caracterizadas por diminuição e espaçamento das microvilosidades e surgimento de autofagosomas no citoplasma do enterócito.

Essas alterações causam redução significativa da velocidade de absorção de carboidratos, tanto "in vivo" como "in vitro", em alças isoladas de intestino. Esses efeitos não são potenciados pela administração de lisados bacterianos.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 1 - ANDREWS, A.T. & JAYNE-WILLIAMS, D.J. - The identification of a phytohaemagglutinin in raw navy beans (Phaseolus vulgaris L.) toxic factor for Japanese quail (Coturnix coturnix japonica). Br. J. Nutr., London, 32:181-188, 1974.
- 2 - AREAS, J.A.G. & LAJOLO, F.M. - Determinação enzimática específica de amido, glicose, frutose e sacarose em bananas pré-climatéricas e climatéricas. An. Farm. Quim. S. Paulo, 20:307-318, 1980.
- 3 - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - Official methods of analysis, 11^{ed}, Washington, 1970, p.858.
- 4 - BERKEL, I. et alii - Jejunal mucosa in infantile malnutrition. Acta Paediatr. Scand., Stockholm, 59:58-64, 1970.
- 5 - BERNFELD, P. - Amylases α and β . Meth. Enzymol., New York, 1:149-154, 1955.
- 6 - BIER, O. - Bacteriologia e Imunologia, 17^{ed}. Editora Melhoramentos, São Paulo, FENAME, 1976.

* De acordo com as normas preconizadas pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos de periódicos estão de acordo com World Medical Periodicals, 3.ed., New York, 1961.

- 7 - BOYD, W.C. & SHAPLEIGH, E. - Separation of individuals of any blood group into secretors and non secretors by use of a plant agglutinin (Lectin). Blood, New York, 9:1195-7, 1954.
- 8 - BRUNSER, O. et alii - Fine structure of the small intestinal mucosa in infantile marasmic malnutrition. Gastroenterology, Baltimore, 70:495-507, 1976.
- 9 - CRANE, R.K. & WILSON, T.H. - In vitro method for the study of the rate of intestinal absorption of sugar. J. Appl. Physiol., Bethesda, 12:145-8, 1958.
- 10 - CREAMER, B. - The turnover of epithelium of the small intestine. Br. Med. Bull., London, 23:226-30, 1967.
- 11 - CROWLE, A.J. - Immunodiffusion. Academic Press, London, 1961, 310 p.
- 12 - DAHLQUIST, A. - Localization of the small-intestinal disaccharidases. Amer. J. Clin. Nutr., Bethesda, 20:81-8, 1967.
- 13 - DAHLQUIST, A. - Assay of intestinal disaccharidases. Anal. Biochem., Baltimore, 22:99-107, 1968.
- 14 - DE ANGELIS, R.C. - Contribuição ao estudo dos mecanismos de absorção intestinal de tiamina. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina da U.S.P., 1968.
- 15 - DEREN, J.J. et alii - Effect of diet upon intestinal disaccharidases and disaccharide absorption. J. Clin. Invest., New York, 46:186-95, 1967.

- 16 - DUBRAY, G. & BEZARD, G. - A highly sensitive periodic acid-silver stain for 1,2-diol groups of glycoproteins and polysaccharides in polyacrilamide gels. Analytical Biochemistry, London, 119:325-9, 1982.
- 17 - ETZLER, M.E. - Quantification and isolation of Ricinus communis lectin receptor from surface of crypt cells of rat intestinal epithelium. FEBS Letters, Amsterdam, 75:231-6, 1977.
- 18 - EVANS, R.J. et alii - Isolation and properties of protein fractions from navy beans (Phaseolus vulgaris) which inhibit growth of rats. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 303:175-84, 1973.
- 19 - FELSTED, R.L. et alii - Phytohemagglutinin isolectin subunit composition. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 668:132-40, 1981.
- 20 - FIGUEROA, M.O.R. - Ação anti-nutricional das fito-hemaglutinas das variedades Jalo e Rico 23, do Phaseolus vulgaris L. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da U.S.P., 1981.
- 21 - FORD, W.W. - Plant poisons and their antibodies. Zentralbl. Bakteriöl Parasitenk, Jena, Abt. I. Ref. 58:129, 1913.
- 22 - GILL, D.M. - Seven toxic peptides that cross cell membranes. In. Bacterial toxins and cell membranes. Ed WADSTRÖM, T., Academic Press, London, 1978, 432 p.
- 23 - GODDARD, V.R. & MENDEL, L.B. - Plant hemagglutinins with special reference to a preparation from the navy bean. J. Biol. Chem., Baltimore, 82:447, 1929.

- 24 - GONZALEZ, C, et alii - Lactase and sucrase activities in the intestinal mucosa of malnourished infants. Proc. IX Annual Meeting, Latin American Society for Pediatric Research, Valdivia, Chile, 1969.
- 25 - HONAVAR, P.M. et alii - Inhibition of the growth of rats by purified hemagglutinin fractions isolated from Phaseolus vulgaris. J. Nutr., Philadelphia, 77:109-14, 1962.
- 26 - INSTITUTO ADOLFO LUTZ, São Paulo - Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, 2 ed. São Paulo, 1976, 371 p.
- 27 - JAFFÉ, W.G. - Toxicity of raw Kidney-beans. Experientia, Basileia, 15:81, 1949.
- 28 - JAFFÉ, N.G. - Factores tóxicos en leguminosas. Arch. Latinoamer. Nutr., Caracas, 18:205-18, 1968.
- 29 - JAFFÉ, W.G. - Hemagglutinins. In. LIENER, I.E. - Toxic constituents of plant Goodstuffs, New York, Academic Press, 1980, p.73.
- 30 - JAFFÉ, W.G. & BRÜCHER, O. - Toxicidad y especificidad de diferentes fitohemagglutininas de frijoles. Arch. Latinoam. Nutr., Caracas, 22:267-268, 1972.
- 31 - JAFFÉ, W.G. & CAMEJO, G. - La acción de una proteína tóxica, aislada de caraotas negras (Phaseolus vulgaris), sobre la absorción intestinal en ratas. Acta Cientif. Venez., 12:59-61, 1961.
- 32 - JAFFÉ, W.G. & FLORES, M.H. - La cocción de frijoles. Arch. Latinoam. Nutr., Caracas, 25:79-90, 1975.

- 33 - JAFFE, W.G. & GOMES, M.J. - Beans of high or low toxicity .
Qual. Plant. Plant. Foods Hum. Nutr., Haia, 24:359-65 ,
1975.
- 34 - JAFFE, W.G. & LETTE, C.L.V. - Heat-labile growth-inhibiting
factors in beans (Phaseolus vulgaris). J. Nutr., Phila-
delphia, 94:203-210, 1968.
- 35 - JAFFE, W.G. et alii - Nuevos estudios sobre un factor toxi-
co de las caraoas crudas (Phaseolus vulgaris). Arch.
Venez. Nutr., Caracas, 6:195-205, 1955.
- 36 - JAMES, W.P.T. et alii - The turnover of disaccharidases and
brush border proteins in rat intestine. Biochim. Biophys.
Acta, Amsterdam, 230:194-203, 1971.
- 37 - JAYNE-WILLIAMS, D.J. & HEWITT, D. - The relation ship between
the intestinal microflora and the effects of diets
containing raw navy beans (Phaseolus vulgaris) on the
growth of Japanese Quail (coturnix coturnix japonica) .
J. Appl. Bacteriol., London, 35:331-4, 1972.
- 38 - KAKADE, M.L. & EVANS, R.J. - Growth inhibition of rats fed
raw navy beans (Phaseolus vulgaris). J. Nutr., Philadel-
phia, 90:191-8, 1966.
- 39 - KAKADE, M.L. et alii - An evaluation of natural vs synthetic
substrates for measuring the anti-tryptic activity of
soybean samples. Cereal Chem., Saint-Paul, 8:518-26,
1969.
- 40 - KORTE, R. - Heat resistance of phytohemagglutinins in
weaning food mixtures containing beans (Phaseolus vulga -
ris). Ecol. Food Nutr., London, 1:303-7, 1972.

- 41 - LAJOLO, F.M. - Inibidor de amilase de Phaseolus vulgaris. Estudo bromatológico. Tese de Livre-Docência. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - U.S.P., 1977.
- 42 - LAJOLO, F.M. et alii - Estudos bromatológicos de concentrados protéicos obtidos a partir da Sardinella aurita e da Tilapia melanopleura. 1 - Ensaio das proteínas. Arch. Latino-Americano de Nutricion, Caracas, 25:67-78, 1975.
- 43 - LANDSTEINER, K. - In the Specificity of Serological Reactions. Harvard Univ. Press, Cambridge, Mass., 1945.
- 44 - LEAVITT, R.D. et alii - Biological and biochemical properties of Phaseolus vulgaris lectins. J. Biol. Chem., Baltimore, 252:2.961-6, 1977.
- 45 - LECOUNT, T.S. & GREY, R.D. - Transient shortening of microvilli induced by cytoheximide in the duodenal epithelium of the chicken. J. Cell Biol., New York, 53:601-5, 1972.
- 46 - LEVIN, R.J. - Techniques, terminology and parameters in intestinal absorption. Br. Med. Bull., London, 23:209-12, 1967.
- 47 - LIENER, I.E. - Phytohemagglutinins. Annu. Rev. Plant Physiol., Palo Alto, 27:17-22, 1974.
- 48 - LIENER, I.E. - Protease inhibitors and other toxic factor in seeds. In: Plant Proteins, London, G. Norton, 1978, p. 117.
- 49 - LIENER, I.E. - Toxicological considerations in the utilization the new protein foods. In: Biochemical Aspects of New Protein Food, Ed. by Jens Adler-Nissen, 1978.

- 50 - LIMA, A.L. et alii - Propriedades hemaglutinantes, mitogênica e tóxica de variedades brasileiras de feijões (Phaseolus vulgaris L.). Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo, 16:145-54, 1980.
- 51 - LIS, H. & SHARON, N. - The biochemistry of plant lectins (Phytohemagglutinins). Annu. Rev. Biochem., Palo Alto, 222:541-574, 1973.
- 52 - LOWRY, I.E. et alii - Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., Baltimore, 193:265-75, 1951.
- 53 - MANCINI-FILHO, J. & LAJOLO, F.M. - Fatores anti-nutricionais em diferentes variedades de feijões (Phaseolus vulgaris L.). Ciência e Cultura, S. Paulo, 33(1):94-7, 1981.
- 54 - MANCINI-FILHO, J.; SERVOS, S. e LAJOLO, F.M. - Atividade anti-amilásica em preparações de fito-hemaglutininas. Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo, 14:43-54, 1976.
- 55 - MANCINI-FILHO, J.; VIZEU, D.M. e LAJOLO, F.M. - Lectins from red kidney beans: radiation effect on agglutinating and mitogenic activity. J. Food Science, Chicago, 4:1194-6, 1979.
- 56 - MATSUMOTO, I. & OSAWA, T. - The specific purification of various carbohydrate binding hemagglutinins. Biochem. Biophys. Res. Commun., New York, 46:1810-5, 1972.
- 57 - MOSER, H. et alii - Influence of Concanavalin A on protein synthesis and protein release in BHK 21 cells. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 507:445, 1978.
- 58 - NAKANE, L. & KAWADI, P. - Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation. J. Histochem. Cytochem., 22: 1084-91, 1974.

- 59 - NOWELL, P. - Phytohemagglutinin; An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer Res., Chicago, 20:462-466, 1960.
- 60 - NUNGESTER, W.J. & VAN HALSEMA, G. - Reaction of certain phytoagglutinins with Flexner-Jobling carcinoma cells of the rat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., New York, 83:863-6, 1953.
- 61 - OLSNES, S. et alii - Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin. Nature, London, 249:627-31, 1974.
- 62 - OLSNES, S. et alii - Purification and characterization of highly toxic lectin modecin. J. Biol. Chem., Baltimore, 253:5069-73, 1978.
- 63 - ORNSTEIN, L. & DAVIS, B.J. - Disc eletrophoresis. Ann. N.Y. Acad. of Sci., New York, 121:305-427, 1964.
- 64 - PUSZTAI, A. & PALMER, R. - Nutritional evaluation of kidney beans (Phaseolus vulgaris): the toxic principle. J. Sci. Food Agric., London, 28:620-3, 1977.
- 65 - PUSZTAI, A. et alii - Nutritional evaluation of kidney beans (Phaseolus vulgaris): the isolation and partial characterisation of toxic constituents. J. Sci. Food Agric., London, 26:149-56, 1975.
- 66 - PUSZTAI, A. et alii - Nutritional evaluation of kidney beans (Phaseolus vulgaris): chemical composition, lectin content and nutritional value of selected cultivars. J. Sci. Food Agric., London, 30:843-848, 1979.
- 67 - PUSZTAI, A. et alii - The nutritional toxicity of Phaseolus vulgaris lectins. Proc. Nutr. Soc., Cambridge, 38:115-20, 1979.

- 68 - PUSZTAI, A. et alii - A new type of Phaseolus vulgaris (cv. Pinto III) seed lectin: isolation and characterization. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 671:146-154, 1981.
- 69 - RATTRAY, E.A.S. et alii - Toxicity of kidney beans (Phaseolus vulgaris L.) to conventional and gnotobiotic rats. J. Sci. Food Agric., London, 25:1035-40, 1974.
- 70 - ROUANET, J.M. & BESANÇÃO, P. - Effects d'un extrait de phytohemagglutinines sur la croissance, la digestibilité de l'azote et l'activité de l'invertase et de la ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) - ATPase de la muqueuse intestinale chez le rat. Ann.Nutr. Aliment., Paris, 33:405-416, 1979.
- 71 - SANDHOM, M. & SCOTT, M.L. - Binding of lipase, amylase and protease to intestinal epithelium as affected by carbohydrates and lectins in vitro. Acta Vet. Scand., Copenhagen, 20:329-342, 1979.
- 72 - SHARON, N. & LIS, H. - Lectins: cell agglutinating and sugar specific proteins. Science, Washington, 177:949-59, 1972.
- 73 - SILVA, H.G. - Estudo do transporte de monossacarídeos em alças intestinais "in vitro" (intestino delgado) de camundongos em crescimento - Efeito da dieta aprotéica. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, 1973.
- 74 - VOLLER, A. et alii - Microplate enzyme-linked immunoabsorbent assay for chagas disease. Lancet, London, 22:426-9, 1975.
- 75 - YACHNIN, S. & SVENSON, R.H. - The immunological and physicochemical properties of mitogenic proteins derived from Phaseolus vulgaris. Immunology, Oxford, 22:871-883, 1972.

S U M M A R Y

Biological and immunological properties of phytohemagglutins from two brazilian varieties of beans (Phaseolus vulgaris) were studied. Through immunoprecipitation in agar gel, immunoenzymatic assays (ELISA) and eletrophoretic behavior after affinity chromatography purification it was shown that the lectins are similar.

Both lectins when given to rats are toxic. They reduce growth and intestinal dissacharidase activity. They also able to smooth the "microvillous" of the enterocyte and to induce the appearance of autophagosomes in the enterocyte cytoplasm. All this modification result in a reduced rate of carbohydrates absorption either in "vitro" or "in vivo".