



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ

DÉBORA COSTA FERNANDES

**AVALIAÇÃO DA LECTINA DE *Canavalia maritima* Thours,
EM EVENTO VASCULAR DA INFLAMAÇÃO AGUDA**

FORTALEZA – CEARÁ

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ

DÉBORA COSTA FERNANDES

**AVALIAÇÃO DA LECTINA DE *Canavalia maritima* Thours,
EM EVENTO VASCULAR DA INFLAMAÇÃO AGUDA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Ceará como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Sampaio Assereuy

FORTALEZA – CEARÁ

2008

P667a Fernandes, Débora Costa
Avaliação da lectina de *Canavalia maritima* Thours em
evento vascular da inflamação aguda. / Débora Costa
Fernandes. __ Fortaleza, 2008

87p; il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Sampaio Assereuy

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências
Fisiológicas) __ Universidade Estadual do Ceará, Centro de
Ciências da Saúde.

1. *Canavalia maritima*. 2. Lectina. 3. Inflamação. I.
Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde.

CDD 574.1

Título do Trabalho: Avaliação da lectina de *Canavalia maritima* Thours em evento vascular da inflamação aguda

Autora: Débora Costa Fernandes

Defesa em: 02/04/2008

Conceito obtido: Aprovada

Nota obtida: 9,0

Banca examinadora

Profa. Dra. Ana Maria Sampaio Assereuy
Orientadora
Universidade Estadual do Ceará-UECE

Profa. Dra. Maria Gonçalves Pereira
Universidade Estadual do Ceará-UECE

Prof. Dr. Paulo Ferdinando de Melo Oliveira
Faculdade Integrada do Ceará-FIC

*A Deus, ao meu marido, Cláudio Henrique,
às minhas filhas Mariana e Lorena pelo apoio nos
momentos difíceis dessa caminhada.*

Dedico este Trabalho

AGRADECIMENTOS

A Deus, por dar-me forças em todo o momento que d'ELE precisei.

Às minhas filhas, pela existência, por serem peças fundamentais e motivos de alegria em minha vida. Agradeço por todo o amor.

Ao meu marido Cláudio Henrique, pelo exemplo de inteligência, dedicação, capacidade, competência, pela amizade, compreensão e pela ajuda financeira a qual tornou esse trabalho possível.

Aos meus pais (*in memoriam*), Euny e Francisco Fernandes, por ter proporcionado minha formação, permitindo assim a realização de todos os projetos, ao longo de minha vida.

A minha orientadora, Prof. Dra. Ana Maria pelo exemplo de dedicação à pesquisa, orientação, espírito científico, paciência, disponibilidade, apoio, por ter me introduzido nos caminhos da ciência e pela oportunidade a mim oferecida.

A Prof. Dra. Selene Moraes por manter sempre as portas abertas para a pesquisa.

A Prof. Dra. Diana Célia meus sinceros agradecimento, pelas sugestões no início do mestrado.

Ao Prof. Dr. Benildo de Souza Cavada pelo fornecimento da lectina para a realização desse trabalho.

Aos Prof. Drs. Maria Gonçalves Pereira e Ferdinando de Melo Oliveira pela colaboração junto ao LAFFIN e pela participação em minha banca.

Gostaria de agradecer de forma muito especial a Alana pelo companheirismo na realização dos experimentos, pela ajuda nessa dissertação e por me permitir o privilégio de sua convivência e amizade.

À Natalia e demais colegas do LAFFIN pela convivência, amizade e companheirismo nesse laboratório.

A todos os professores do Mestrado Acadêmico de Ciências Fisiológicas pela contribuição em minha formação científica.

À Fundação Cearense de Amparo à pesquisa (FUNCAP) pela concessão de bolsa de estudo como apoio financeiro ao desenvolvimento científico.

A todos a minha mais sincera gratidão.

*"Golpe a golpe, passo a passo,
Caminhante, não há caminho,
o caminho é feito ao andar.*

Antônio Machado

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	08
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
1 INTRODUÇÃO	14
1.1 LECTINAS	14
1.2 LECTINAS DE LEGUMINOSAS	18
1.3 <i>Canavalia maritima</i>	21
1.4 RESPOSTA INFLAMATÓRIA	24
1.4.1 EVENTOS VASCULARES	26
1.4.2 EVENTOS CELULARES	28
1.5 DOR INFLAMATÓRIA	30
2 JUSTIFICATIVAS	32
3 OBJETIVOS	33
4 MATERIAIS	34
4.1 LECTINA DE <i>Canavalia maritima</i>	34
4.2 ANIMAIS	34
4.3 DROGAS E REAGENTES	34
5 MÉTODOS	35
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE DA LECTINA DE <i>Canavalia maritima</i> EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO E NOCICEPÇÃO	35
5.1.1 MODELO DE EDEMA DE PATA	35
5.1.2 TESTE DA FORMALINA	37
5.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE APÓS TRATAMENTO ENDOVENOSO COM A LECTINA DE <i>Canavalia maritima</i>	38
6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39

7 RESULTADOS	40
7.1 EFEITO EDEMATOGÊNICO DA LECTINA DE <i>Canavalia maritima</i> EM RATOS	40
7.2 A LECTINA DE <i>Canavalia maritima</i> INDUZ AUMENTO DE PERMEABILIDADE VASCULAR EM RATOS.....	40
7.3 PARTICIPAÇÃO DO DOMÍNIO LECTÍNICO NA ATIVIDADE EDEMATOGÊNICO DA LECTINA DE <i>Canavalia maritima</i>	42
7.4 O EFEITO EDEMATOGÊNICO DA LECTINA DE <i>Canavalia maritima</i> ENVOLVE A PARTICIPAÇÃO DE VÁRIOS MEDIADORES DA INFLAMAÇÃO	44
7.5 EFEITO INIBITÓRIO DA LECTINA DE <i>Canavalia maritima</i> SOBRE O EDEMA DE PATA EM RATOS INDUZIDO POR CARRAGENINA E DEXTRANA	51
7.6 A ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA DA LECTINA DE <i>Canavalia maritima</i> NÃO ENVOLVE A PARTICIPAÇÃO DO DOMÍNIO LECTÍNICO	54
7.7 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO ENDOVENOSO DA LECTINA DE <i>Canavalia maritima</i> SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR ELA PRÓPRIA EM RATOS	56
7.8 A LECTINA DE <i>Canavalia maritima</i> APRESENTA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA NA FASE INFLAMATÓRIA DO TESTE DA FORMALINA EM CAMUNDONGOS	58
7.9 EFEITO DO TRATAMENTO SUBCRÔNICO COM A LECTINA DE <i>Canavalia maritima</i> EM RATOS	60
8 DISCUSSÃO	64
9 CONCLUSÕES	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
ADP	Adenosina Dinucleotídeo Fosfato
ALT	Alanina Amino Transferase (enzima)
AMINO	Aminoguanidina
ANOVA	Análise de Variância
ASC	Área sob a Curva
AST	Aspartato Amino Transferase (enzima)
Ach	Acetilcolina
COX - 1	Ciclooxygenase - 1
COX - 2	Ciclooxygenase - 2
ConA	Concanavalina; lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
ConM	Lectina de sementes de <i>Canavalia maritima</i>
C3a	Terceiro componente do sistema complemento ativado
C5a	Quinto componente do sistema complemento ativado
Cg	Carragenina
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDRF	Fatores relaxantes derivado do endotélio
EPM	Erro padrão da média
eNOS	Isoforma endotelial da enzima óxido nítrico sintase (Endothelial form of nitric oxide synthase)
e.v.	Endovenosa
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
HE	Hematoxilina eosina
ICAM-1e ICAM-2	Moléculas de adesão intercelular-1 e 2 (Intercellular Adhesion Molecule)
IL-1	Interleucina-1
IL-4	Interleucina-4
IL-8	Interleucina-8

iNOS	Isoforma induzida da enzima óxido nítrico sintase (Inducible form of nitric oxide synthase)
i.p.	Intraperitoneal
IP ₃	Trifosfato de inositol
L-NAME	N ^G - nitro-L-arginina-metil-éster
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOSi	Isoforma induzível da NOS
NFA	Ácido Niflúmico
PAF	Fator de ativação de plaquetas (Platelet Activator Factor)
PBS	Solução salina tamponada com fosfato (Phosphate Buffered Saline)
PCAM-1	Molécula de adesão de célula endotelial e plaqueta
PG	Prostaglandinas
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGI	prostaciclina
RIPs	Proteínas inativadoras de ribossomos (Ribosome Inactivating Proteins)
s.c.	Subcutânea
SNC	Sistema nervoso central
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (Tumoral Necrosis Factor-alpha)
VCAM-1	Molécula de adesão vascular (Vascular Adhesion Molecule)
WGA	Lectina do germe do trigo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Tipos de lectinas, de acordo com seus sítios de atividade biológica.....	16
Figura 2	Leguminosa <i>Canavalia maritima</i> TOURS (feijão da praia).....	22
Figura 3	Detalhe do sítio de ligação a carboidratos da <i>Canavalia maritima</i> complexada com o oligossacarídeo maltose.....	23
Figura 4	Visão geral da estrutura tetramérica da lectina de sementes de <i>Canavalia maritima</i>	24
Figura 5	Alinhamento de seqüências da lectina de <i>Canavalia marítima</i>	26
Figura 6	Seqüência de eventos leucocitários na inflamação.....	30
Figura 7	Atividade edematogênica da lectina de <i>Canavalia maritima</i>	41
Figura 8	A lectina de <i>Canavalia maritima</i> induz aumento de permeabilidade vascular.....	42
Figura 9	O efeito edematogênico da lectina de <i>Canavalia maritima</i> é inibido pela associação lectina e maltose.....	43
Figura 10	L-NAME não inibe o edema de pata induzido pela lectina de <i>Canavalia marítima</i>	46
Figura 11	Meclizina inibe o edema de pata induzido pela lectina de <i>Canavalia marítima</i>	47
Figura 12	Pentoxifilina inibe o edema de pata induzido pela lectina de <i>Canavalia marítima</i>	48
Figura 13	Indometacina inibe o edema de pata induzido pela lectina de <i>Canavalia marítima</i>	49
Figura 14	NFA inibe o edema de pata induzido pela lectina de <i>Canavalia maritima</i>	50
Figura 15	A lectina de <i>Canavalia maritima</i> inibe o edema de pata induzido por carragenina em ratos.....	52
Figura 16	A lectina de <i>Canavalia maritima</i> inibe o edema de pata induzido por dextrana em ratos.....	53

Figura 17	O efeito antiedematogênico da lectina de <i>Canavalia maritima</i> sobre o edema de pata induzido por carragenina não envolve a participação do domínio lectínico.....	55
Figura 18	A lectina de <i>Canavalia maritima</i> não inibe o edema de pata provocado por ela própria em ratos.....	57
Figura 19	A lectina de <i>Canavalia maritima</i> inibe a fase inflamatória do teste de formalina em camundongos.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Inibição do curso temporal do edema induzido pela lectina de <i>Canavalia maritima</i> por bloqueadores farmacológicos.....	51
Tabela 2	O tratamento de ratos com a lectina de <i>Canavalia maritima</i> não altera o peso corporal dos animais e o peso úmido de seus órgãos..	61
Tabela 3	Tratamento de ratos com a lectina de <i>Canavalia maritima</i> não altera o leucograma dos animais.....	62
Tabela 4	O tratamento de ratos com a lectina de <i>Canavalia maritima</i> não altera o padrão de vários parâmetros bioquímicos.....	63

RESUMO

Lectinas são (glico)proteínas de origem não imune, que têm sido utilizadas no estudo da inflamação, devido ao reconhecimento de resíduos de carboidratos presentes nas membranas das células inflamatórias, através de seus domínios lectínicos. A lectina isolada da leguminosa *Canavalia maritima* (ConM) apresenta especificidade de reconhecimento por resíduos de maltose e trealose, com maior afinidade por dissacarídeos. A atividade, disponível na literatura, desta molécula foi demonstrada apenas *in vitro*. Assim, objetivou-se investigar a atividade da ConM *in vivo* em eventos vasculares do processo inflamatório agudo, suas propriedades antinociceptivas e toxicidade. Foram utilizados ratos Wistar machos (150-250g) na inflamação e nos ensaios de toxicidade, e camundongos Swiss albinos machos (20-35g) nos estudos de nocicepção. O estudo da atividade da ConM na inflamação foi feito utilizando-se o modelo de edema de pata. Quanto à atividade anti-edematogênica, os animais foram injetados e.v. com a lectina (0,01; 0,1 e 1 mg/kg), 30 minutos antes dos estímulos carragenina (2 mg/pata) e dextrana (300 µg/pata). Quanto à atividade pró-edematogênica, a lectina foi injetada (0,01; 0,1 e 1 mg/kg) por via s.c. intraplantar como estímulo. Em ambos, a participação do domínio lectínico foi avaliada pela incubação da lectina, à 37° durante 30 min., com seu açúcar ligante maltose (0,1M). Para a avaliação do aumento de permeabilidade vascular induzido pela ConM, os animais receberam a lectina (0,1mg/kg; s.c.) 30 min após a injeção de azul de Evans (25 mg/kg; e.v.), sendo sacrificados 30 min após. A quantificação do extravasamento protéico foi feita por espectrofotometria (A600 nm). No estudo do mecanismo da ação edematogênica da ConM, os animais foram tratados ½ ou 1h antes da lectina (1mg/kg; s.c.) com: L-NAME (300mg/kg; e.v.), meclizina (40mg/kg; s.c.), pentoxifilina (90mg/kg; s.c.), indometacina (5 mg/kg; s.c.), ácido niflúmico (30mg/kg; i.p.), ou com a própria ConM (1mg/kg; e.v.). A atividade antinociceptiva da ConM foi avaliada no teste da formalina, pela injeção da lectina (0,1, 1 e 10 mg/Kg; e.v.) 30 min antes da indução da nocicepção por formalina (20µl a 2,5% v/v). A toxicidade foi avaliada após o tratamento de ratos com a ConM (1mg/kg) durante 7 dias, acompanhando-se os seguintes parâmetros: funções do rim e fígado (peso úmido, dosagem de creatinina e uréia, cinética da aspartato amino transaminase e alanina amino transaminase), peso úmido do coração e baço, variação de massa corporal, leucograma e dosagem de proteínas totais, albumina e globulina como indicadores do equilíbrio osmótico. Resultados expressos como Média ± E.P.M. e analisados por ANOVA e teste de Ducan (p<0,05 fixado para indicar significância estatística). Por via sistêmica, a ConM na dose de 1mg/kg inibiu o edema de pata induzido em ratos por carragenina e dextrana, em 43% e 27%, respectivamente, não tendo mostrado sinais de toxicidade após 7 dias de tratamento. Nas doses de 1 e 10 mg/Kg, esta lectina inibiu a segunda fase da nocicepção induzida por formalina em camundongos, em cerca de 59% e 54%, respectivamente. Entretanto, por via local, a ConM mostrou ação edematogênica acompanhada de aumento de permeabilidade vascular de cerca de 37%. O efeito edematogênico, mas não o antiedematogênico da ConM foi prevenido em 48% pela administração conjunta de maltose. O edema induzido pela ConM foi inibido por meclizina (55%), ácido niflúmico (49%), pentoxifilina (37%) e indometacina (37%), mas não por L-NAME ou pela própria lectina. Em suma, a ConM injetada sistemicamente apresentou atividade antinociceptiva e em menor escala, ação antiedematogênica. Por outro lado, injetada localmente apresentou atividade edematogênica, cuja potência foi dez vezes maior do que a atividade antiedematogênica, mostrando o envolvimento de histamina, canais de cloreto, IL-1, TNF- α e prostaglandinas. Os efeitos pró-inflamatórios da ConM, mas não os anti-inflamatórios, parecem envolver o domínio lectínico. Este estudo abre perspectivas para a utilização da ConM como ferramenta farmacológica no estudo de condições inflamatórias e nociceptivas, auxiliando na descoberta de novas drogas.

Palavras-chave: *Canavalia maritima*; lectina; inflamação.

ABSTRACT

Lectins are (glyco)proteins of non-immune origin, that have been used in the study of inflammation due to their capability to recognize carbohydrate residues present in the membrane of inflammatory cells via the lectin domain. The lectin isolated from the leguminous *Canavalia maritima* (ConM) presents binding specificity to maltose and trehalose, with more affinity to disaccharides. In literature, this lectin activity was demonstrated only in *in vitro* experiments. Thus, the aim of this study was to investigate the ConM activity *in vivo* in vascular events of acute inflammation, its antinociceptive properties and toxicity. Male Wistar rats (150-250g) were used in inflammation and also in the toxicity assays, and male Swiss mice (20-35g) in the nociception studies. The ConM activity in inflammation was tested in the paw edema model. In respect to the anti-edematogenic activity, animals were injected i.v. with the lectin (0.01; 0.1 and 1 mg/kg), 30 min. before the pro-inflammatory agents carragenan (2 mg/paw) or dextran (300 µg/paw). For the pro-edematogenic activity, the lectin was injected (0.01; 0.1 and 1 mg/kg) by s.c. intraplantar route as stimuli. In both protocols, the participation of the lectin domain was evaluated by incubation of the lectin, at 37° for 30 min., with its binding sugar maltose (0.1M). In the evaluation of the increase in vascular permeability induced by ConM, animals received the lectin (0.1mg/kg; s.c.) 30 min after injection of Evans blue (25 mg/kg; i.v.), and were sacrificed 30 min later. Protein leakage was evaluated by spectrophotometry (A600 nm). In order to investigate the mechanism of ConM edematogenic effect, animals were treated ½ or 1h before lectin (1mg/kg; s.c.) with L-NAME (300mg/kg; i.v.), meclizine (40mg/kg; s.c.), pentoxifylline (90mg/kg; s.c.), indomethacin (5 mg/kg; s.c.), niflumic acid (30mg/kg; i.p.), or with the lectin itself at 1mg/kg (i.v.). The ConM antinociceptive effect was evaluated in the formalin test, via lectin injection of 0.1, 1 or 10 mg/Kg (i.v.), 30 min before induction of nociception by formalin (20µl at 2.5% v/v). The lectin toxicity was evaluated after 7 days of animals treatment with ConM (1mg/kg), analyzing the following parameters: renal and hepatic function (wet weight, creatinine and urea dosage, kinetic of serum transaminase activity, heart and spleen wet weight, variation in body mass, leukogram and total protein dosage and albumin and globulin as indicators of osmotic equilibrium. Results were expressed as Mean ± E.P.M. and analyzed by ANOVA and Duncan's test ($p < 0.05$ fixed to indicate statistical difference). Via systemic route, ConM at 1mg/kg inhibited the rat paw edema induced by carragenan and dextran, around 43% and 27%, respectively, without showing any sign of toxicity after 7 days of treatment. At 1 and 10 mg/Kg, this lectin inhibited the late phase of the nociception induced by formalin in mice, around 59% and 54%, respectively. However, by local route, ConM showed edematogenic effect which was followed by the increase in vascular permeability of 37%. The edematogenic, but not the anti-edematogenic effect of ConM was prevented around 48% by the co-administration with maltose. The ConM-induced edema was also inhibited by meclizine (55%), niflumic acid (49%), pentoxifylline (37%) or indomethacin (37%), but not by L-NAME or by the lectin itself. Summarizing, ConM systemically injected presented antinociceptive action and in less extension, anti-edematogenic action. On the other hand, when locally injected, showed edematogenic potentiality, whose potency was about 10 times higher than its anti-edematogenic effect. This data demonstrates the participation of histamine, chloride channels, IL-1, TNF- α and prostaglandins in the lectin pro-inflammatory effect. The edematogenic effect of ConM, but not its anti-edematogenic, seems to involve the lectin domain. The present study opens perspectives for the use of ConM as a pharmacological tool in the study of inflammatory and nociception conditions and suggests its utility for new drugs design.

Key word: *Canavalia maritima*; lectin; inflammation.

1 INTRODUÇÃO

Em processos normais ou patológicos, as células devem ser capazes de interagir com o meio ambiente através de sinais, recebendo estes do meio extracelular e repassando-os para o interior da célula. Para a transdução desses sinais, além das interações entre proteína extracelular e receptor protéico de superfície celular, outras interações importantes são as do tipo carboidrato-proteína. Laine (1994) sugeriu que proteínas apresentam a capacidade de se ligar a carboidratos complexos e decifrar informações por eles codificadas. Sabendo-se que todas as células têm um revestimento de carboidrato complexados a proteínas (glicoproteínas) e a lipídios (glicolipídios), podemos perceber a importância e o poder biológico dessas moléculas nos processos fisiológicos e patológicos através de sua capacidade de mediar e codificar interações celulares. Entre as proteínas que se ligam a resíduos glicídicos específicos estão as lectinas (BREWER *et al.*, 2002). As interações celulares mediadas por lectinas podem ocorrer de duas maneiras: quando lectinas da superfície celular transduzem um sinal depois da interação com o sacarídeo ligante ou quando lectinas solúveis se ligam a carboidratos de glicolipídios ou glicoproteínas na superfície celular (BREWER *et al.*, 2002). Essas possibilidades proporcionam uma via informacional onde os carboidratos fornecem mais informações por unidade de peso que os ácidos nucléicos e proteínas (SHARON; LIS, 1993).

1.1 LECTINAS

A primeira lectina vegetal, a ricina, foi descoberta por Stillmark (1888) a partir de sementes de *Ricinus communis* L. (conhecida vulgarmente como mamona) que descreveu a habilidade desta em aglutinar eritrócitos, sem imaginar que ela possuía sítios de ligação para grupos de carboidratos. Desde esta época, muitas pesquisas têm descoberto novas substâncias de origem vegetal que exibem atividade hemaglutinante, chamadas fitohemaglutininas, mas somente em 1954, Boyd e Sharpleigh propuseram o termo lectina, do latim “*legere*”, para nomear essas moléculas com capacidade de escolher, selecionar (MOREIRA *et al.*, 1991). Posteriormente,

Peumans e Van Damme (1995) definiram lectinas como proteínas de origem não imune para distingui-las de anticorpos anti-carboidratos que também são capazes de aglutinar células. Porém, enquanto os anticorpos são estruturalmente similares, as lectinas diferem em vários aspectos como a composição e a seqüência de aminoácidos, o requerimento de metais, o peso molecular e a estrutura tridimensional. Além disso, as lectinas também são encontradas em plantas e bactérias, que não possuem sistema imune (LIS; SHARON, 1981; MOREIRA *et al.*, 1991). Na definição atual para lectinas, o único pré-requisito necessário para que uma proteína seja denominada como tal é apresentar pelo menos um sítio de ligação não catalítico, o qual se ligue de forma reversível e específica a mono ou oligossacarídeos, sendo este domínio denominado domínio lectínico (PEUMANS; VAN DAMME BEUTH, 1995).

Ainda em 1995, Peumans e Van Damme propuseram a classificação, atualmente a mais aceita para lectinas, de acordo com seus sítios de atividade biológica, em três grupos: merolectinas, hololectinas e quimerolectinas:

1. As merolectinas são biomoléculas formadas exclusivamente por um único sítio de ligações a carboidratos, têm baixo peso molecular e devido à sua natureza monovalente são incapazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Como representantes dessa classe têm-se as lectinas de orquídea, específicas para manose.

2. As hololectinas são proteínas que apresentam mais de um sítio de ligação para carboidratos, os quais são idênticos ou homólogos, estando aptas a aglutinar células ou precipitar conjugados, tendo como representante a maioria das lectinas vegetais por se comportarem como hemaglutininas.

3. As quimerolectinas são lectinas que possuem um ou mais sítios de ligação a carboidratos, além de possuir outro sítio não lectínico com atividade biológica, agindo independente dos primeiros. As proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2 (RIPs) podem ser citadas como exemplos dessa classe. Posteriormente, Peumans e Van Damme (1998) adicionaram o grupo das superlectinas. Esse termo é reservado a lectinas, como a de tulipa, que apresentam dois ou mais sítios lectínicos, porém com especificidades a carboidratos diferentes.

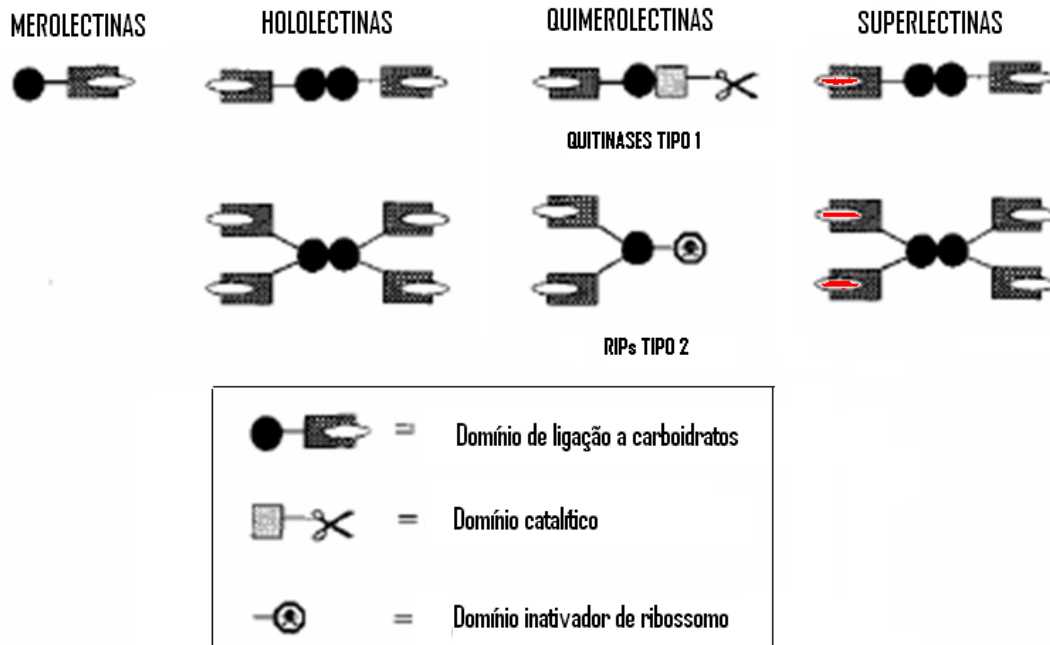


Figura 1. Tipos de lectinas de acordo com seus sítios de atividade biológica. (Adaptado de Peumans e Van Damme, 1995, 1998).

As lectinas são moléculas largamente distribuídas na natureza, podendo ser encontradas nos seis grandes grupos da classificação geral dos seres vivos: nos Reinos Archeobactéria, Eubactéria, Protista, Fungi, Plantae e Animalia, assim como nos vírus (SHARON; LIS, 1997).

As lectinas do reino Plantae foram as primeiras proteínas estudadas devido à facilidade de detecção, isolamento e elevada concentração protéica em suas sementes maduras. A utilização da cromatografia de afinidade, para isolamento de lectinas, usada pela primeira vez por Agrawal e Goldestein (1965), contribuiu para o desenvolvimento desse campo. Van Damme *et al.* (1998) dividiram as lectinas vegetais em sete diferentes famílias: 1. lectinas de leguminosas (onde se inclui a lectina investigada neste estudo); 2. lectinas de monocotiledôneas ligadoras de manose; 3. lectinas ligadoras de quitina; 4. lectinas RIPs tipo 2; 5. lectinas semelhantes à jacalina; 6. lectinas semelhantes à amarantina e 7. lectinas de floema de curcubitácea.

As lectinas formam uma classe de glicoproteínas bastante heterogênea estruturalmente. A especificidade dessas proteínas é variável e está associada com a habilidade de interagir com carboidratos, além de precipitar polissacarídeos, glicoproteínas e glicolípídeos dotados de resíduos de açúcares específicos (SINGH *et al.*, 1999). A diversidade estrutural das lectinas pode ser aumentada pela ligação covalente de diferentes grupamentos funcionais como sulfatos, fosfatos, e grupos acetil aos açúcares. Somado à sua grande diversidade estrutural, a associação de lectinas com glicoconjugados solúveis e/ou de superfície tem o potencial de modificar a atividade das proteínas às quais elas estão ligadas (FEIZI, 1985; RADEMACHER *et al.*, 1988).

Vistas a alta estabilidade e disponibilidade de numerosas lectinas com distintas especificidades, estas podem ter aplicação em diversos campos de interesse clínico como: marcadores de diferenciação celular, agentes carreadores de quimioterápicos, caracterização de doenças, alvos de drogas (FEIZI, 1985; RADEMACHER *et al.*, 1988), tipagem de grupos sanguíneos, mitógenos, marcadores epidemiológicos e taxonômicos de diversos microorganismos (SLIFKIN; DOYLE, 1990) e também como poderosas ferramentas nos estudos de biologia celular e molecular, imunologia, e outras áreas relacionadas (MOREIRA *et al.*, 1991).

A descoberta da patogênese de algumas doenças infecto-contagiosas como a pneumonia, abriu horizontes para o desenvolvimento de terapêuticas alternativas baseadas no conhecimento sobre a interação lectínica. A exemplo disso, Beuth *et al.* (1995) conseguiram inibir a adesão de *Streptococcus pneumoniae* em pulmão de camundongos com a administração de N-acetilglicosamina na traquéia dos mesmos.

Lectinas também influenciaram avanços na endocrinologia. Como exemplo, foi relatada a fosforilação do receptor para insulina, induzida por lectinas vegetais glicose/manose específicas *in vitro* (CAVADA *et al.*, 2003).

O melhor entendimento acerca dessas proteínas levou a um grande avanço no campo da oncologia, uma vez que já foi comprovado que lectinas promovem adesão de células tumorais a tecidos alvos de maneira específica (SHLYAKHOVENKO *et al.*, 1995), sendo úteis como marcadores de células cancerígenas no sangue (LOTAN; RAZ, 1988). Alguns autores também têm demonstrado atividade anti-tumoral

(ANDRADE *et al.*, 2004) e indução de apoptose em células tumorais por lectinas vegetais (HOSTANSKA *et al.*, 2003). Também foi demonstrado a perda da habilidade de colonização de certas células tumorais a seus respectivos tecidos alvos, através de modificações de oligossacarídeos dos glicoconjugados existentes nas superfícies das células estudadas (SCHAAF-LAFONTAINE *et al.*, 1985). Destaca-se ainda a vantagem da associação de fármacos quimioterápicos a lectinas ligantes de glicoconjugados presentes na superfície de células tumorais, o que possibilita um direcionamento desses fármacos, bem como a diminuição da dose terapêutica das mesmas (GOLDSTEIN *et al.*, 1980).

1.2 LECTINAS DE LEGUMINOSAS

A ampla distribuição de lectinas em quase todas as famílias vegetais juntamente com a conservação de suas principais características pode indicar que essas proteínas são essenciais para a sobrevivência das espécies (MOREIRA *et al.*, 1991). Várias hipóteses sobre as funções fisiológicas das lectinas de leguminosas nas plantas têm sido sugeridas, baseando-se em suas propriedades e localização. Lectinas podem exercer papéis como proteínas de reserva, no mecanismo de defesa contra patógenos (LIS; SHARON, 1986, MIRELMAN *et al.*, 1975; ETZLER, 1986), na regulação de fitohormônios que controlam o crescimento e desenvolvimento da planta; no armazenamento ou transporte de carboidratos em sementes (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997) e na associação do vegetal a simbioses (SHARON; LIS, 2004). A principal fonte de lectinas de leguminosas são suas sementes, que podem conter mais de 10% de sua massa. Uma pequena quantidade de lectina ainda pode estar presente em outros tecidos como folhas, casca do caule e raízes.

As lectinas de leguminosas consistem usualmente de duas a quatro subunidades, as quais possuem um sítio de ligação a açúcares que são idênticos em espécies distintas, podendo conter íons Ca^{++} ou Mn^{++} , essenciais para sua estrutura e/ou função. Contêm ainda uma cavidade hidrofóbica, primeiramente descrita para a concanavalina A (ConA) por Becker *et al.* (1975). Esta cavidade consiste, principalmente, de resíduos hidrofóbicos conservados, os quais podem estar envolvidos

na ligação das lectinas a hormônios vegetais (EDELMAN; WANG, 1978). São proteínas de peso molecular variável, entre 25 – 30 kD, cuja estrutura revela principalmente a presença de folhas pregueadas e segmentos de α -hélice pequenos ou ausentes. A maioria das lectinas são glicoproteínas que contém por vezes, mais do que 10% de carboidratos na forma de um pequeno número de subunidades N-ligadas (SHARON; LIS, 1990). A afinidade de reconhecimento a carboidratos de lectinas vegetais é variável, existindo grupos com especificidade de ligação a glicose/manose, a N-acetilglicosamina, N-galactosamina, L-fucose e ácido siálico (MOREIRA *et al.*, 1991). Os resultados disponíveis hoje na literatura indicam que, apesar das diferenças na especificidade por carboidratos, as lectinas vegetais mostram elevado grau de homologia em suas sequências de aminoácidos e são relativamente similares em relação às suas propriedades bioquímicas e físico-químicas, mas com intensidades diferentes (CAVADA *et al.*, 1993; 2001).

Inúmeras atividades biológicas de lectinas de leguminosas têm sido demonstradas. Em experimentos *in vitro*, estas lectinas são capazes de aglutinar eritrócitos, leucócitos, fibroblastos e células tumorais (BEUTH *et al.*, 1995; GOLDSTEIN; AMOS, 1990) e também de provocar: proliferação de linfócitos humanos e produção de interferon- γ por lectinas da subtribo Diocleinae (BARRAL-NETO *et al.*, 1992); estimulação de macrófagos peritoneais de camundongos e liberação de peróxido de hidrogênio por lectinas com afinidade de ligação a glicose-manose tais como ConA, *Canavalia brasiliensis* e *Dioclea grandiflora* (RODRIGUEZ *et al.*, 1992); liberação de histamina por mastócitos peritoneais de ratos pelas lectinas de *C. brasiliensis*, *D. Rostrata*, *D. virgata* e ConA (GOMES *et al.*, 1994); produção de óxido nítrico (NO) por células peritoneais murinas pelas lectinas de *C. brasiliensis*, *D. grandiflora*, *Pisum arvense* e ConA (ANDRADE *et al.*, 1999); indução de apoptose (BARBOSA *et al.*, 2001); migração de leucócitos peritoneais pela lectina de *P. arvense* (ALENCAR *et al.*, 2005) e *Vatairea macrocarpa* (ALENCAR *et al.*, 2007).

Em experimentos *in vivo* demonstrou-se: formação de edema de pata em ratos pelas lectinas de *V. macrocarpa* (ALENCAR *et al.* 2004), *C. brasiliensis* e *D. grandiflora* (BENTO *et al.*, 1993); migração de leucócitos peritoneais induzida pelas lectinas de *C. brasiliensis* e *D. grandiflora* (BENTO *et al.*, 1993; COELHO *et al.*, 2006),

V. macrocarpa (ALENCAR *et al.*, 2003), *P. arvense* (ALENCAR *et al.*, 2005); proteção parcial em camundongos infectados com *Leishmania amazonensis* pela lectina de *C. brasiliensis* (BARRAL-NETO *et al.*, 1996) alteração da pressão de perfusão e resistência vascular renal pelas lectinas de *Dioclea guianenses*, *Canavalia ensiformes* (HAVT *et al.*, 2003) e *Vaitarea macrocarpa* (MARTINS *et al.*, 2005); inibição da entrada do vírus HIV por lectinas ligadoras de manose (BALZARINI *et al.*, 2004); produção de NO por células peritoneais murinas pelas lectinas de *C. brasiliensis*, *D. grandiflora*, *P. arvense* e ConA (ANDRADE *et al.*, 1999).

Com relação aos efeitos *in vivo* de lectinas na inflamação, observa-se que a maioria se refere as suas ações pró-inflamatórias quando estas são injetadas localmente nos animais. No entanto, nosso grupo demonstrou que por via endovenosa as lectinas agem como antiinflamatórias em vários modelos experimentais: lectinas ligadoras de glicose e manose promoveram inibição da migração de neutrófilos para cavidade peritoneal e do edema de pata em ratos (ASSREUY *et al.*, 1997; ALENCAR *et al.*, 1999), bem como da cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida em camundongos (ASSREUY *et al.*, 1999). Além disso, a lectina de *Lonchocarpus sericeus*, lectina ligadora de N-acetil-glicosamina inibiu o edema de pata (ALENCAR *et al.*, 1999) e a peritonite infecciosa (ALENCAR *et al.*, 2005) em ratos; a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal de camundongos e a nocicepção mecânica via inibição da produção de citocinas e quimiocinas (NAPIMOGA *et al.*, 2007).

Também têm sido demonstrados importantes efeitos sobre a contratilidade do músculo liso. O tratamento de coelhos com ricina, lectina extraída da planta *Ricinus communis*, aumentou significativamente a contração induzida por serotonina e histamina em artérias coronárias (ZHANG *et al.*, 1994); a ConA e a lectina do germe do trigo (WGA) produzem relaxamento dependente de endotélio em aorta de coelho (KLEHA *et al.*, 1991). As lectinas de *Bryothamnion triquetrum* e *Canavalia maritima* relaxam aortas de ratos via ativação da enzima óxido nítrico sintase (LIMA *et al.*, 2004; GADELHA *et al.*, 2005).

O gênero *Canavalia* se distingue dentro da tribo *Diocleinae*, a qual pertence, por diversos caracteres morfológicos que as definem como uma entidade taxonômica homogênea, a qual serve de referência para sua rápida identificação entre os demais

gêneros que fazem parte desta subtribo. O gênero *Canavalia* possui aproximadamente 60 espécies e é comum ao velho e ao novo mundo. Pelo menos 4 espécies de *Canavalia* são cultivadas como forrageira e alimento enquanto que as demais espécies, são silvestres em seus respectivos habitats naturais (MATOS *et al.*, 2004).

1.3 *Canavalia maritima*

A *Canavalia maritima* Thours é uma planta pertencente à família Leguminosae, subfamília Papiloneidae, Tribo Phaseoleae, subtribo Diocleinae (DAM *et al.*, 1998) é popularmente conhecida como feijão da praia ou feijão da Baía (EDWARD, 1999). Apresenta como sinônimos botânicos: *Canavalia rosea* (SW.) e *Dolichos maritimus* Aublet, embora seja mais comum à denominação *C. maritima* Thouars desde 1813. Esta espécie é amplamente encontrada na África, Ásia, Oceania, Austrália, América do Norte (Flórida), América Central e América do Sul (Colômbia, Venezuela, Equador, Galápagos, Peru, Guianas Francesas, Guianas, Suriname e Brasil) (MATOS *et al.*, 2004). A *Canavalia maritima* é uma espécie comum em ambientes marinhos, sobretudo nas praias e costas tropicais e subtropicais de ambos dos hemisférios norte e sul. Nestes locais aparece sobre rochas ou matagais, onde é pioneira nos solos arenosos das dunas e praias (D'ARCY, 1980).

De cobertura rasteira, possui folhas trifolhadas alternadas e boleadas no ápice. A cor verde brilhante e as pequenas flores que variam do róseo ao roxo da *Canavalia maritima* são mantidas durante todo o ano. Após a queda das flores nascem robustas vagens que podem variar de tamanho entre 10 e 15 cm e conter entre três e sete sementes de cor cinza, muito duras e resistentes, as quais contêm uma toxina chamada canavanina muito venenosa para os insetos. Por esse motivo dificilmente se encontra uma dessas sementes danificadas (Figura 2).

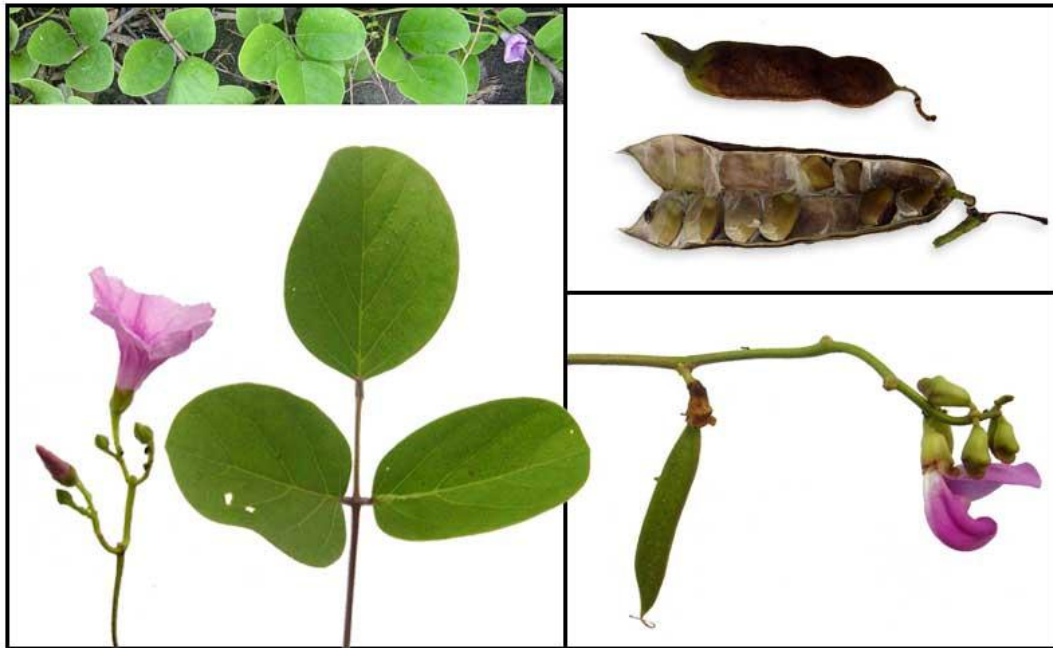


Figura 2. Leguminosa *Canavalia maritima* TOURS (feijão da praia)

A lectina de *Canavalia maritima* (ConM) é uma hololectina, purificada e descrita por Moreira e Cavada (1984), apresenta especificidade de reconhecimento por resíduos de maltose e trealose com maior afinidade por dissacarídeos em relação a monossacarídeos (DELATORRE *et al.*, 2006). A Figura 3 mostra a estrutura tridimensional de ConM complexada com maltose (são 8 as pontes de hidrogênio que conectam o oligossacarídeo aos resíduos de aminoácidos que formam o sítio de ligação a monossacarídeos).

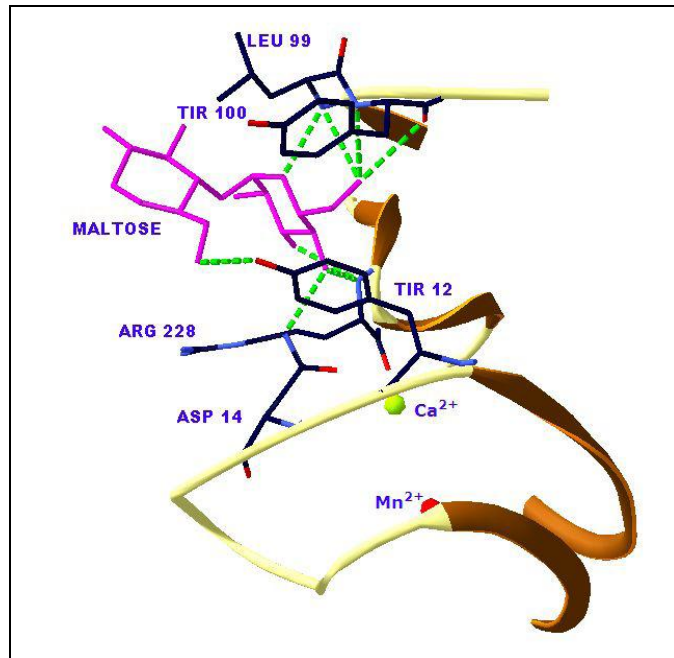


Figura 3. Detalhe do sítio de ligação a carboidratos da ConM complexada com o oligossacarídeo maltose.

A estrutura tridimensional completa da ConM nativa é mostrada na Figura 4. O tetrâmero consiste de dois dímeros canônicos de lectinas de leguminosas, sendo cada monômero formado por uma cadeia polipeptídica de 237 resíduos de aminoácidos. A Figura 5 mostra o alinhamento de seqüências primárias da lectina de *Canavalia maritima*.

Pouco se conhece na literatura sobre os efeitos biológicos da lectina de *C. maritima*. Além disso, demonstramos recentemente que esta produz relaxamento do músculo liso vascular em aortas isoladas de ratos via liberação de NO (GADELHA *et al.*, 2005).

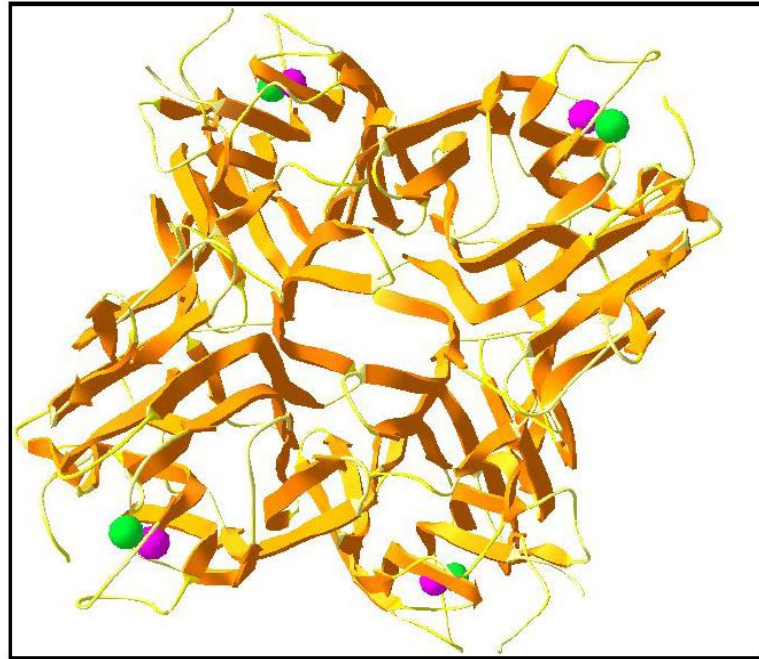


Figura 4. Visão geral da estrutura tetramérica da lectina de sementes de *Canavalia maritima* (ConM). Nos "loops" superficiais em cada um dos monômeros podem ser vistos os sítios de ligação ao Ca^{2+} (bolas verdes) e ao Mn^{2+} (bolas violetas).

ConM	ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNGKVGTAHIIYNSVGKR	60
ConM	LSAVVSYPNGDSATVSYDVDLDNVLPWVRVGLSASTGLYKETNTILSWFTSKLKSNST	120
ConM	HETNALHFSFNQFSKDQKDLILQGDATTGTGDNLELTRVSSNGSPQGSSVGRALFYAPVH	180
ConM	IWESSAVVASFDATFTFLIKSSDSHPADGIAFFISNIDSSIPSGSTGRLLGLFPDAN	237

Figura 5. Alinhamento de seqüências da lectina de *C. maritima* (ConM). As cores representam: vermelho, os aminoácidos pequenos e os hidrofóbicos (AVFPMILW); azul, os resíduos ácidos (DE); rosa, os resíduos básicos (RHK); verde, as cadeias laterais com hidroxilas, amínicas e básicas, além da glutamina (STYHCNGQ).

1.4 RESPOSTA INFLAMATÓRIA

A inflamação é um importante mecanismo de defesa do organismo e se constitui de uma resposta complexa a um tecido vascularizado contra estímulos agressores de origem química, física ou biológica tendo como objetivo destruir, imobilizar ou diluir o agente lesivo. As principais células efetoras da resposta

inflamatória são os neutrófilos, basófilos, eosinófilos, macrófagos teciduais e mastócitos. Embora estruturalmente distintas, essas células têm muitas características comuns, como a presença de receptores, estocagem de enzimas hidrolíticas, geração de metabólitos do ácido araquidônico e a capacidade de fagocitar e secretar (ROBBINS *et al.*, 1994).

As respostas inflamatórias que ocorrem localmente nos tecidos após a invasão ou agressão dos tecidos do hospedeiro podem ser divididas em eventos vasculares (vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, extravasamento de líquidos e proteínas plasmáticas para o espaço extravascular) e celulares (migração de leucócitos para o foco inflamatório que envolve a adesão e transmigração destas células para o sítio de inflamação) (ROCHA; SILVA, 1992; SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1985). Os eventos vasculares favorecem a ocorrência dos eventos celulares. Além disso, mediadores vasoativos e quimiotáticos liberados pelo próprio infiltrado celular contribuem para a amplificação dos eventos vasculares (BEVILACQUA *et al.*, 1994).

A reação inflamatória ocorre em duas fases. A fase inicial, chamada de fase aguda, pode ser definida como a resposta do tecido vivo vascularizado a uma agressão local. Geralmente tem duração relativamente curta e as primeiras manifestações clínicas observadas incluem: eritema, edema local, febre e dor, descritas por Cornelius Celsus no início da era cristã (sinais cardinais da inflamação). Virchow, no século XIX, apontou a perda de função do tecido ou órgão lesado, como o quinto sinal cardinal (ROCHA; SILVA, 1978). Além disso, a fase aguda apresenta infiltrado predominantemente neutrofílico. A segunda denomina-se fase crônica, de duração mais longa e associada à presença de linfócitos e macrófagos, proliferação vascular, fibrose e necrose tecidual (SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1985).

As respostas envolvidas nos eventos inflamatórios, em qualquer fase do processo, podem ser originadas de mecanismos diretos, em que o próprio agente agressor atua sobre a parede vascular, ou indiretos, em que há ação de mediadores químicos que podem ativar receptores nas células endoteliais. Esses mediadores químicos podem ter origem tecidual ou plasmática. Os de origem tecidual são produzidos como consequência da ativação de células por estímulos inflamatórios,

sejam elas residentes ou não (SALVEMINI *et al.*, 1999; KATZ *et al.*, 1984). Aqueles mediadores de origem plasmática, são formados a partir da ativação de quatro cascatas enzimáticas, a saber: sistema da coagulação (trombina, plasmina), sistema fibrinolítico (fibrina), sistema das cininas (bradicinina) e sistema do complemento (C3b, C5a) (ROBBINS *et al.*, 1994).

Em determinadas condições, o processo inflamatório torna-se prejudicial às células normais do hospedeiro, onde a resposta defensiva dos leucócitos através da liberação de mediadores inflamatórios para destruir os microorganismos e tecidos necróticos, pode causar lesão tissular e prolongar a inflamação. Em vista disso, pode ser necessário que os mediadores envolvidos sejam modulados negativamente (BAUHMANN; GAULDIE, 1994, BROID, 1991) pelo uso de agentes antiinflamatórios.

1.4.1 EVENTOS VASCULARES

As alterações do fluxo e do calibre vascular ocorrem muito rapidamente após agressão e se desenvolvem em velocidades variáveis, na dependência da gravidade da lesão. Durante a resposta inflamatória ocorre uma vasoconstrição transitória seguida de vasodilatação, responsável pelo aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade vascular, que levam ao escape de líquido rico em proteínas, o exudato, para o interstício. Isto reduz a pressão osmótica intravascular e aumenta a do líquido intersticial. Esse fenômeno, associado ao aumento da pressão hidrostática secundária à vasodilatação e ao extravasamento de líquidos para o espaço intersticial caracterizam o edema. Posteriormente, ocorre a estase sanguínea advinda do aumento de permeabilidade da microvasculatura, uma vez que o extravasamento de líquidos e proteínas para o interstício provoca hemoconcentração, aumentando a viscosidade sanguínea e gerando o alentecimento da circulação.

Todos os processos vasculares são modulados por mediadores químicos que incluem a bradicinina, o fator ativador de plaquetas (PAF), a serotonina, a histamina, o óxido nítrico (NO), as citocinas como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF- α), e as prostaglandinas da série E (PGE₂) e da série I (PGI₂ ou prostaciclina).

As prostaglandinas são metabólitos do ácido araquidônico formados em consequência da ativação da via enzimática das ciclooxigenases. Estas enzimas existem sob duas isoformas, uma constitutiva, a ciclooxigenase-1 (COX-1), que tem clara função fisiológica e sua ativação leva à produção de baixas quantidades de prostaglandinas. Outra, induzida, a ciclooxigenase-2 (COX-2), produz prostaglandinas em grandes quantidades, responsáveis pelos eventos inflamatórios.

Em 1987, foi demonstrado que um dos EDRFs liberados pelas células endoteliais é o NO (PALMER *et al.*, 1987, MONCADA *et al.*, 1991), que tem participação no controle do fluxo sanguíneo (FORTES *et al.*, 1994) e na permeabilidade vascular induzida por PAF e pela própria bradicinina (MAYHAN, 1992). A L-arginina é o precursor da síntese do NO, que em combinação com o oxigênio molecular é catalisada pela enzima óxido nítrico-sintase (NOS), responsável pela síntese do NO. Três isoformas de NOS são descritas, sendo duas constitutivas, a endotelial (eNOS) e a neuronal (nNOS), e uma NOS induzida (iNOS) (NATHAN, 1997; THIEMERMAN, 1997).

A histamina é uma amina formada pela descarboxilação do aminoácido histidina, que se encontra complexada com heparina e proteínas ácidas no interior granular, sendo suas atividades biológicas atribuídas a ativação dos receptores H₁, H₂, H₃ e H₄ (MARONE *et al.*, 2002). Dentre seus efeitos estão dilatação das arteríolas, aumento da permeabilidade vascular e vasoconstrição venular (ROBBINS *et al.*, 1994).

As citocinas são polipeptídios envolvidos nas respostas imunológicas e que desempenham papéis importantes na resposta inflamatória. As principais citocinas mediadoras de inflamação são a IL-1, o TNF- α e a família IL-8. Seus efeitos mais importantes na inflamação são sobre o endotélio, leucócitos, fibroblastos e indução de reações sistêmicas de fase aguda (ROBBINS *et al.*, 1994).

A resposta inflamatória possui características diferentes de acordo com o tipo de estímulo. Por exemplo, a dextrana provoca numa fase inicial a liberação de mediadores vasoativos, como histamina, serotonina e numa fase tardia prostaglandinas e NO. Esse estímulo caracteriza-se por produzir um edema osmótico sem infiltrado celular (LO *et al.*, 1982). Já a carragenina promove a liberação de uma série de mediadores químicos, como histamina, serotonina, bradicinina também numa fase inicial, e NO, prostaglandinas, IL-1, TNF- α numa fase tardia, induzindo um edema rico

em infiltrado celular (DiROSA *et al.*, 1971). O edema causado por estes agentes flogísticos têm sido amplamente empregado como modelo experimental para o estudo da inflamação (KATZ *et al.*, 1984) e as substâncias capazes de inibi-lo têm sido consideradas bons agentes anti-inflamatórios (GODHWANI *et al.*, 1987).

1.4.2 EVENTOS CELULARES

As alterações celulares ocorridas variam de acordo com o tipo de estímulo e estágio em que a lesão se encontra. Tais alterações, nas primeiras 24 horas, se caracterizam por um infiltrado de origem neutrofílica, que com o decorrer do processo vai sendo substituído por células mononucleares. Os leucócitos alcançam o foco da infecção devido a uma série de alterações locais que resultam na adesão destas células ao endotélio vascular e componente da matriz extracelular, e posterior passagem das mesmas para o espaço extravascular.

Os fenômenos celulares da inflamação envolvem o acionamento das capacidades celulares de movimentação, de adesão e de englobamento de partículas cujo principal fenômeno é a saída de leucócitos da luz vascular e sua migração para o local agredido. Esse fenômeno segue a seguinte seqüência: marginação, rolamento (adesão fraca), adesão firme, diapedese e quimiotaxia.

Na marginação, devido à quebra do fluxo laminar que leva a estase sanguínea, os leucócitos posicionam-se adjacentes às células do endotélio. Posteriormente, estas células aderem frouxamente à parede do endotélio resultando no seu rolamento ao longo da parede do vaso, que ocorre principalmente pela ação das moléculas de adesão presentes nos leucócitos e nas células endoteliais que se encaixam de maneira complementar. As moléculas de adesão são representadas por três famílias: as selectinas, as integrinas e as imunoglobulinas (McEVER, 1991). As selectinas (E, P e L), denominadas de acordo com o tecido no qual foram identificadas, são proteínas responsáveis pela adesão transitória de leucócitos ao endotélio e se ligam através do seu domínio lectínico: as L-selectinas são encontradas nos leucócitos e responsáveis pelo endereçamento durante a interação com ligantes endoteliais (KANSAS, 1996); as E-selectinas são expressas em grandes quantidades nas células

endoteliais, após ativação por citocinas inflamatórias, e em pequenas quantidades em outros leitos vasculares; as P-selectinas são armazenadas em alfa-grânulos de plaquetas e corpos de Weibel-Palade das células endoteliais, e prontamente posicionadas na membrana plasmática após estímulo específico.

Após o rolamento, segue-se a adesão firme mediada por imunoglobulinas e β -2 integrinas. As integrinas são moléculas heterodiméricas formadas por duas subunidades (α e β) que possibilitam a ligação firme dos leucócitos através de diversas combinações por ligantes expressos ao longo do endotélio vascular (imunoglobulinas, fibrinogênio, fibronectina, trombospondina, fator de Von Willebrand e colágeno) (COLLINS, 1995) e que podem ter sua expressão aumentada após ativação por mediadores inflamatórios como o PAF ou citocinas. As imunoglobulinas são proteínas que também executam um importante papel na adesão estável e na transmigração de leucócitos por ligarem-se às integrinas expressas nessas células: ICAM-1 (Molécula de adesão intercelular-1), ICAM-2 (Molécula de adesão intercelular-2), VCAM-1 (molécula de adesão vascular) e PCAM-1 (molécula de adesão de célula endotelial e plaqueta). Os mediadores inflamatórios liberados por células residentes ativadas podem agir aumentando a avidéz de ligação entre as moléculas de integrinas e imunoglobulinas, favorecendo a adesão firme (CRONSTEIN; WEISSMAN, 1993; PANÉS, 1999).

Após os processos adesivos, os leucócitos escapam para o espaço extracelular através de fendas existentes entre as células do endotélio, fenômeno denominado diapedese. Posteriormente, estas células migram em direção ao local da lesão tecidual por um processo chamado quimiotaxia, através da ligação de um estímulo quimiotático a receptores específicos nos leucócitos, a favor de um gradiente químico. A ligação do estímulo quimiotático induz aumento de Ca^{++} citoplasmático (pelo sistema de segundo mensageiro IP_3 e DAG) promovendo a interação de actina e miosina (presentes no citoplasma do neutrófilo) provocando a emissão de pseudópodes.

Tanto substâncias exógenas quanto endógenas podem atuar como quimioatrativos. Os mediadores químicos endógenos incluem os componentes do sistema complemento, em especial C3b; os produtos da metabolização do ácido araquidônico pela via das lipoxigenases, especialmente o LTB₄; e as citocinas como a

IL- 8 (ROBBINS *et al.*, 1994)(Figura 6).

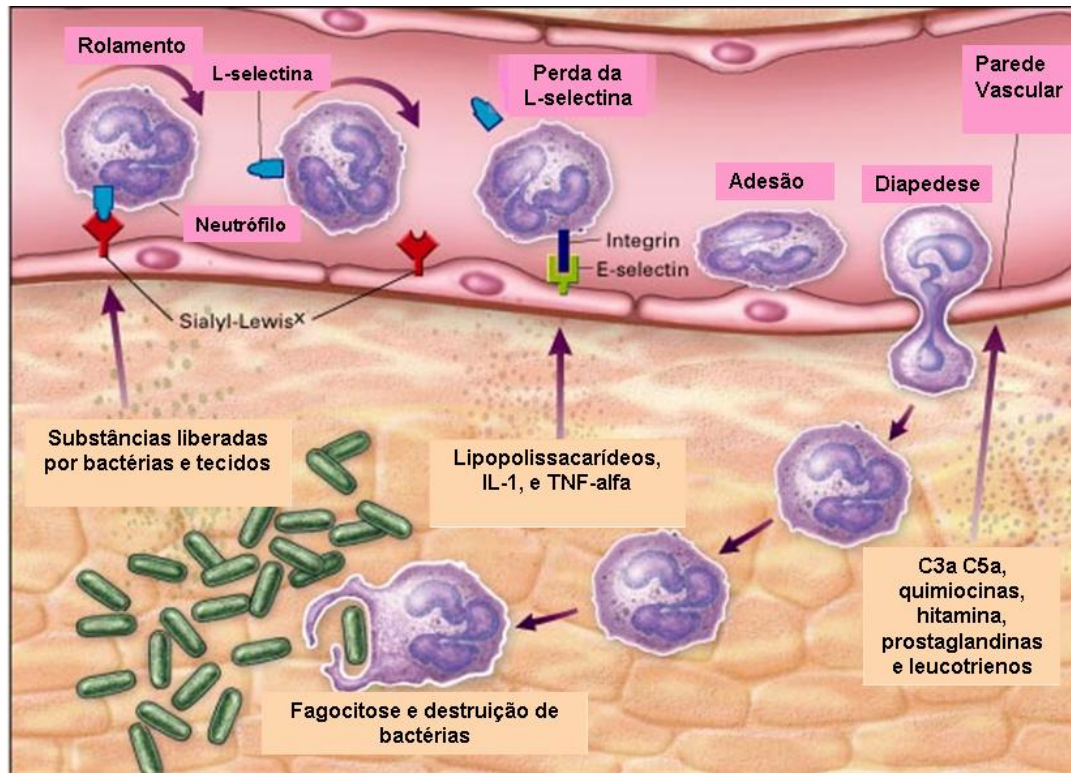


Figura 6. Seqüência de eventos leucocitários na inflamação. A figura representa às etapas de rolamento, adesão e migração celular ativadas após a invasão tecidual por bactérias, bem como a liberação de mediadores locais, que estarão estreitamente relacionados aos eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória.

1.5 DOR INFLAMATÓRIA

O papel da dor inflamatória no processo de defesa do organismo é claramente sinalizar a ocorrência de dano tissular ou iminente, limitando a movimentação com o objetivo de reduzir a disseminação do agente etiológico ou de prevenir futuras lesões tissulares (LEVINE; REICHLING, 1999).

A transmissão do estímulo doloroso ao sistema nervoso central (SNC) envolve interações complexas com estruturas periféricas ativadas pela estimulação térmica, mecânica ou química, e centrais da superfície da pele ao córtex cerebral (FURST, 1999). As células responsáveis pela captação destes estímulos são chamadas

de nociceptores e estão localizadas na pele, músculos, vasos, fáscia, juntas e vísceras (GRUBB, 1998, BENSSON, 1999).

A intensidade da sensação dolorosa está diretamente relacionada com a capacidade do estímulo ocasionar dano tecidual, ocasião em que há liberação de mediadores químicos no local, a partir de terminações sensoriais primárias e células não neuronais como fibroblastos, mastócitos, neutrófilos e plaquetas (TEIXEIRA *et al.*, 1994). Entre os mediadores envolvidos nesse sinal estão as prostaglandinas (PGE) e leucotrienos, histamina, serotonina (5-HT), acetilcolina (Ach), citocinas, glutamato, óxido nítrico (NO), adenosinatrifosfato (ATP), adenosinadifosfato (ADP), substância P, somatoquinina, polipeptídeos vasoativos, colecistoquinina e muitos outros.

A ação direta ou indireta de mediadores químicos produzidos ou liberados seguido ao dano tecidual, ou a ação de irritantes exógenos (formalina, ácido acético, capsaicina, venenos, etc.), são os grandes responsáveis pela multiplicidade de eventos que ocorre durante a transmissão da dor (FÜRST, 1999; MILLAN, 1999; CALIXTO *et al.*, 2000) Destacam-se: vasoconstrição, vasodilatação, contração muscular, edema, ativação de canais iônicos, alteração de permeabilidade iônica da membrana, pápula, rubor, entre outros (FURST, 1999; MILLAN, 1999; CALIXTO *et al.*, 2000). Além desses, demonstrou-se a importância de certas citocinas (TNF- α , IL-8 e IL-4) na mediação da nocicepção resultante da estimulação de células residentes (THOMAZZI *et al.*, 1997; CUNHA *et al.*, 1999). Esses mediadores podem ser classificados em agentes ativadores diretos e agentes hiperalgésicos ou sensibilizadores de nociceptores (MONCADA *et al.*, 1978).

É provável que a sensibilização dos nociceptores seja um fator importante nas muitas formas de dor inflamatória. Desse modo, substâncias de fontes naturais capazes de modular negativamente os mediadores nociceptivos e inflamatórios, possam ser considerados interessantes analgésicos e antiinflamatórios alternativos.

2 JUSTIFICATIVAS

O estudo dos mecanismos e dos mediadores envolvidos na inflamação e dor vem sendo alvo de inúmeras pesquisas ao longo dos últimos anos. Adicionalmente, diversos produtos naturais obtidos de diferentes espécies vegetais tem apresentado eficientes atividades antiinflamatórias e antinociceptivas além de contribuir no conhecimento das complexas vias relacionadas com a inflamação e dor.

O envolvimento de lectinas de leguminosas em eventos celulares e vasculares do processo inflamatório agudo, somado a demonstração de que a lectina de *Canavalia maritima* estimula células endoteliais a liberar óxido nítrico, importante mediador inflamatório, justifica o estudo desta lectina em modelos experimentais de inflamação aguda bem como, na fase inflamatória da nocicepção..

O completo entendimento das bases moleculares desses mecanismos entre essas moléculas é de grande relevância para o entendimento dos fenômenos biológicos das funções desempenhadas por essas moléculas e de forma secundária, para sua exploração como ferramenta farmacológica útil no estudo de processos inflamatórios ou para a construção de medicamentos com propriedades antiinflamatórias ou imunoestimuladores, visando a solução de problemas associados à terapia convencional tais como efeitos colaterais, toxicidade e custo elevado.

3. OBJETIVOS

Investigar experimentalmente as propriedades da lectina de sementes de *Canavalia maritima* na inflamação aguda e seu respectivo mecanismo de ação, bem como suas ações sobre a fase inflamatória da nocicepção e possíveis sinais de toxicidade.

Mais especificamente pretende-se:

1. Investigar *in vivo* uma possível atividade pró-inflamatória da ConM no modelo de edema de pata;
2. Estudar o efeito da ConM sobre o edema de pata induzido por estímulos inflamatórios osmóticos (dextrana) e não osmóticos (carragenina);
3. Investigar o envolvimento do domínio lectínico no possível efeito da ConM no modelo utilizado;
4. Estudar o efeito da ConM sobre o aumento da permeabilidade vascular induzida pela ConM;
5. Avaliar a atividade de diferentes mediadores inflamatórios sobre o efeito da ConM;
6. Avaliar a fase inflamatória da nocicepção através do teste da formalina em camundongos;
7. Determinar a toxicidade aguda da lectina através da avaliação dos parâmetros: leucograma, massa corpórea, aspecto macroscópico de órgãos vitais, aspecto microscópico do fígado, função renal e hepática.

4 MATERIAIS

4.1 LECTINA DE *Canavalia maritima*

A lectina utilizada foi isolada de sementes da espécie *Canavalia maritima* Thours, coletadas na praia do Cofeco, município de Fortaleza, estado do Ceará. O isolamento e purificação foi realizado através de cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 no Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC).

4.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos e fêmeas (*Rattus norvegicus*) com peso entre 150 e 250g e camundongos Swiss machos (*Mus musculus*) com peso entre 25 a 35 g. Estes animais, procedentes do Biotério Central do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC), foram mantidos no Instituto Superior de Ciências Biomédicas da Universidade Estadual do Ceará (UECE) em gaiolas apropriadas, recebendo ração e água *ad libitum*, sob condições adequadas de luz e temperatura. Os protocolos utilizados nesse trabalho atenderam os padrões éticos estabelecidos pelo comitê de ética desta Universidade.

4.3 DROGAS E REAGENTES

- Azul de Evans - Sigma Chemical;
- Ácido niflúmico (NFA) - Sigma Chemical ;
- Carragenina- λ - Sigma Chemical ;
- Dextrana - Sigma Chemical;
- Indometacina – Prodome Química e Farmacêutica ;
- L-nitro-arginina metil éster (L-NAME) - Sigma Chemical ;

- Maltose -Sigma Chemical ;
- Meclizina - Laboratório Apsen ;
- NaCl 0,9% - Fresenius ;
- Pentoxifilina - Sigma Chemical ;

Dissolução: Todas as soluções foram preparadas imediatamente antes do uso e dissolvidas em solução salina estéril , com exceção da indometacina e da pentoxifilina que foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) e solução salina tamponada com fosfato (PBS), respectivamente. Todos os sais e drogas utilizados foram de pureza analítica.

5 MÉTODOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DA LECTINA DE *Canavalia maritima* EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO E NOCICEPÇÃO

5.1.1 MODELO DE EDEMA DE PATA

Este modelo foi utilizado para avaliar a capacidade da lectina em induzir, ou inibir o edema de pata /permeabilidade vascular provocado por diversos estímulos inflamatórios. Também foram estudados os mediadores envolvidos e a participação do domínio lectínico nesses efeitos.

Os volumes de líquido deslocados pelas patas direitas de cada rato foram medidos pletismograficamente antes (tempo zero) e após 30 min., 1, 2, 3, 4, 8, 24 e 48h a injeção subcutânea (s.c.) intraplantar dos estímulos inflamatórios (agentes flogísticos, lectina ou mediadores inflamatórios). O edema foi calculado como a diferença entre o volume de líquido deslocado antes e após o estímulo e expresso em mL. As áreas sob as curvas (ASC) foram calculadas usando o método do trapézio (LANDUCCI *et al.*, 1995) e expressas em unidades arbitrárias.

a) Avaliação das atividades edematogênica e antiedematogênica:

Para a avaliação da atividade edematogênica, a lectina de *C. maritima* foi administrada s.c. como estímulo nas doses de 0,01; 0,1 ou 1,0mg/Kg contidos em 0,1mL/100g de peso corporal. O curso temporal de desenvolvimento do edema foi acompanhado até a 4^a h. O grupo controle negativo de edema recebeu apenas salina estéril s.c.

Para a avaliação da atividade antiedematogênica, a lectina de *C. maritima* foi administrada por via endovenosa (e.v.) nas doses de 0,01; 0,1 ou 1,0 mg/Kg contidos em 0,1mL/100g de peso corporal, 30 min. antes da aplicação s.c. dos estímulos inflamatórios (carragenina; 2 mg/pata ou dextrana; 300 µg/pata) contidos em 0,1 mL/100g de peso corporal. O grupo controle positivo de edema foi administrado com carragenina ou dextrana e o controle negativo com salina s.c.

b) Avaliação do mecanismo das ações edematogênica e anti-edematogênica da lectina de *Canavalia maritima*

- **participação de resíduos de carboidratos:** a lectina de *C. maritima* foi administrada por via subcutânea (atividade pró-inflamatória) ou e.v. (atividade antiinflamatória) sozinha ou em associação ao seu açúcar ligante maltose 0,1M após 30 min de incubação a 37°C.

- **participação de mediadores inflamatórios:** os animais foram pré-tratados com os seguintes bloqueadores farmacológicos, antes da indução do edema de pata pela lectina (1mg/kg; s.c.); L-NAME (300mg/kg; e.v. 1h antes), NFA (30mg/kg; i.p. 30min. antes), indometacina (5 mg/kg; s.c. 1h antes), pentoxifilina (90mg/kg; s.c. 1h antes), meclizina (40mg/kg; s.c. 30min. antes) (FEITOSA *et al.* 2002; DI ROSA *et al.* 1971).

- **avaliação da interferência da via de administração:** os animais receberam a *C. maritima* (0,01; 0,1 e 1 mg/kg) por via endovenosa 30 min. antes da administração da própria lectina (1mg/kg), por via subcutânea intraplantar.

Método da permeabilidade vascular:

A metodologia empregada para a quantificação da permeabilidade vascular foi baseada no método utilizado por Garcia-Leme e Wilhelm (1975). Os animais receberam azul de Evans (25 mg/kg) por via endovenosa intrapeniana e após 30 minutos cada animal recebeu como estímulo inflamatório a lectina de *Canavalia marítima* (0,1mg/kg) ou salina estéril (0,01 ml/100g de peso corporal) por via s.c. intraplantar. Passados 30 minutos da administração da lectina, foi realizado o sacrifício dos animais por deslocamento cervical, sendo então as patas seccionadas logo abaixo do maléolo, pesadas e incubadas em 3 ml de formamida, à temperatura de 36°C por 72hs. O azul de Evans extraído dos tecidos foi quantificado por espectrofotometria (A600 nm). Os dados obtidos em absorbância foram convertidos em µg de azul de Evans/g pata, através de regressão linear baseado em uma curva padrão.

Protocolo de avaliação da permeabilidade vascular:

Para avaliação do aumento de permeabilidade vascular induzido pela lectina de *C. marítima*, trinta minutos após a injeção endovenosa de azul de Evans, os animais receberam a lectina (0,1mg/kg; s.c.) contidos em 0,1mL/100g de peso corporal, sendo sacrificados 30 min após. O grupo controle recebeu salina estéril s.c. em substituição à lectina.

5.1.2 TESTE DA FORMALINA

Método: os camundongos foram injetados com formalina (20µl de uma solução a 2,5% v/v) na pata direita traseira (s.c. intraplantar) e com salina estéril na pata contralateral e colocados, individualmente, sob campânulas transparentes (funis de vidro de 20cm de

diâmetro) ao lado de espelhos para facilitar a observação. Foi registrado o tempo, transcorrido em segundos, em que os animais passaram lambendo a pata injetada nos períodos de 0-5 min. (fase inicial) e 15-30 min. (fase tardia) (HUNSKAAR *et al.*, 1985; SANTOS *et al.*, 1995; ROSLAND *et al.*, 1990).

Todos os testes foram realizados à temperatura ambiente (22-28°C), na ausência de fatores que pudessem afetar o fluxo sanguíneo periférico devido à grande sensibilidade da resposta na fase tardia (LE BARS *et al.*, 2001).

Protocolo experimental

Os animais foram tratados com a lectina de *C. maritima* nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/Kg contidos em 0,01/10g de peso corporal por via endovenosa(plexo orbital), 30 minutos antes da injeção s.c. de formalina. Os animais controle receberam salina estéril em substituição à lectina.

5.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE APÓS TRATAMENTO ENDOVENOSO COM A LECTINA DE *Canavalia maritima*

Protocolo experimental: Foram utilizados dois grupos de 7 ratos cada. Um grupo recebeu a lectina em solução durante sete dias por via e.v. (caudal), obedecendo a posologia de dose única diária de 1mg/kg contido em 0,1mL/100g de peso corporal. O grupo controle recebeu o mesmo volume de salina estéril pela mesma via. Após o tratamento, foi feita a avaliação dos parâmetros abaixo descritos.

Parâmetros avaliados:

- **Peso corporal e de órgãos do sistema imune:** os animais foram pesados antes e após o tratamento com a lectina. Após o sacrifício foi feita a excisão do fígado, baço, rim e coração e a pesagem dos mesmos ainda úmidos. O peso de cada órgão foi expresso por 100g de peso corporal e comparado ao grupo controle.

- **Avaliação macroscópica e microscópica:** na avaliação macroscópica foram observadas possíveis alterações (vermelhidão, esteatose, nódulos, focos hemorrágicos) e na avaliação microscópica foi feita a histologia do fígado por ser geralmente o órgão que primeiro apresenta alterações em caso de toxicidade.

- **Leucograma:** imediatamente antes do sacrifício, foi coletado sangue para a contagem total e diferencial de leucócitos. A contagem total foi feita em câmara de Neubauer após diluição (1:20) da amostra em Líquido de Turk. Para a contagem diferencial destas células foram confeccionados esfregaços sobre lâminas de vidro, coradas pelo método da hematoxilina-eosina (HE), utilizando-se microscópio óptico com objetiva de imersão.

- **Testes bioquímicos:** amostras de sangue foram coletadas para a dosagem de uréia e creatinina como indicadores de funções renal e avaliação da atividade das enzimas AST (aspartato transaminase) e ALT (alanina transaminase), bem como a dosagem de proteínas totais, albumina e globulina como indicadores da manutenção do equilíbrio osmótico.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

De todos os experimentos foram calculadas as Médias \pm Erro Padrão da Média (EPM) para um certo número de eventos(n) em cada grupo. As diferenças estatísticas entre os grupos foram obtidas através da análise de variância (ANOVA) e teste de Ducan para dados pareados ou não-pareados. $p < 0,05$ foi fixado para indicar significância estatística.

7. RESULTADOS

7.1 EFEITO EDEMATOGÊNICO DA LECTINA DE *Canavalia maritima* Em Ratos

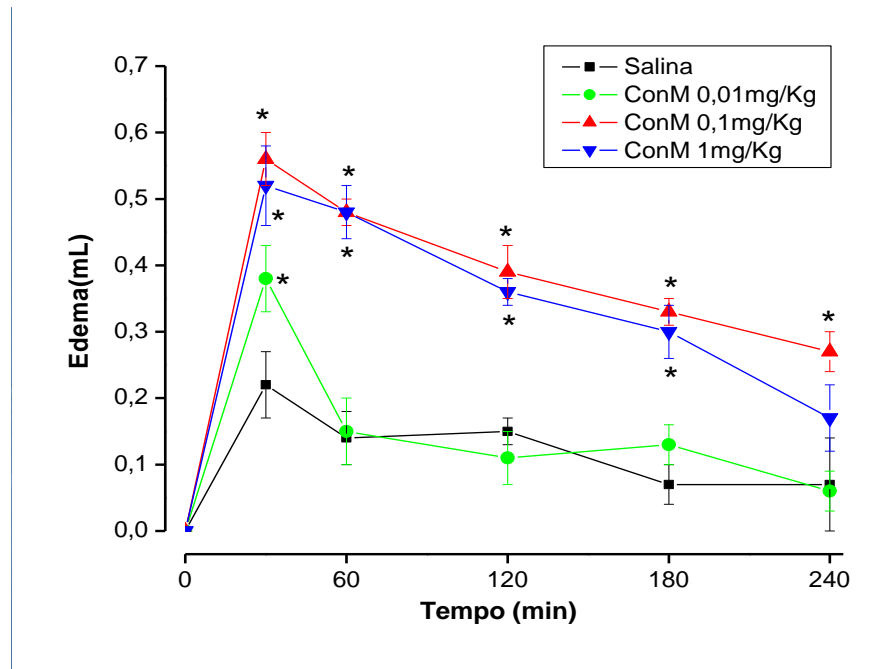
A lectina de *Canavalia maritima* (ConM), administrada por via subcutânea intraplantar nas doses de 0,01; 0,1 e 1mg/Kg, induziu edema de pata em todas as doses testadas com efeito máximo na primeira meia hora após sua administração com curso temporal decrescente. Nas doses de 0,1 e 1mg/Kg, o efeito edematogênico foi mais duradouro, mantendo-se significativo até a quarta hora em relação ao controle (salina). Por outro lado, na dose de 0,01mg/Kg, este efeito foi fulgaz, desaparecendo completamente já ao final de trinta minutos (Figura. 7a).

A atividade edematogênica da ConM nas doses de 0,1 mg/Kg e 1mg/kg foram equivalentes com percentuais de aumento de 8,3 e 7,5 vezes em relação ao controle. Na menor dose utilizada (0,01mg/Kg), o percentual de aumento da atividade edematogênica da ConM foi reduzido para 2,6 vezes em relação ao controle (Figura. 7b). A dose de 0,1 mg/Kg foi escolhida para as demais avaliações (alteração de permeabilidade vascular e participação de mediadores inflamatórios).

7.2 A LECTINA DE *Canavalia maritima* INDUZ AUMENTO DE PERMEABILIDADE VASCULAR EM RATOS

A injeção s.c. intraplantar da ConM (0,1mg/Kg) induziu no seu pico de ação edematogênica um significativo aumento ($67,3 \pm 4,8$; ASC) de permeabilidade vascular (cerca de 37%) nas patas dos animais em relação aos controles ($49,1 \pm 4,8$; ASC), que receberam o mesmo volume de salina (Figura. 8).

a)



b)

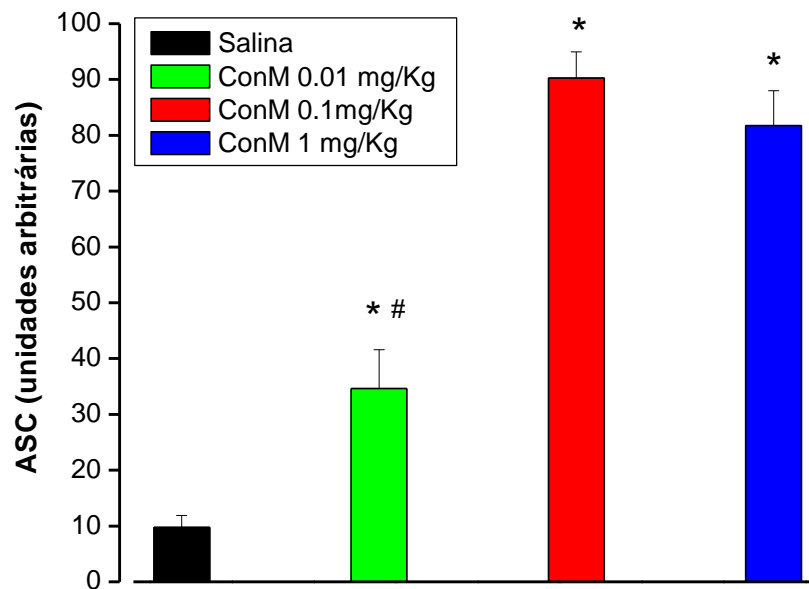


Figura 7. A lectina de *Canavalia maritima* possui atividade edematogênica. A lectina de *C. maritima* (ConM) foi administrada s.c. (0,01; 0,1 e 1 mg/Kg) na pata traseira direita de ratos. O controle negativo recebeu salina estéril (0,01 mL/Kg de peso corporal; s.c.) na pata esquerda. O edema foi medido antes (tempo zero) e 30, 60, 120, 180 e 240 min após a injeção da lectina. a) variação do volume da pata (mL) entre os vários tempos e o tempo zero; b) área sob a curva (ASC) determinada pelo método do trapézio. Média \pm E.P.M. de 6 ratos. * $p < 0,05$ comparado a Salina; # $p < 0,05$ comparado a ConM.

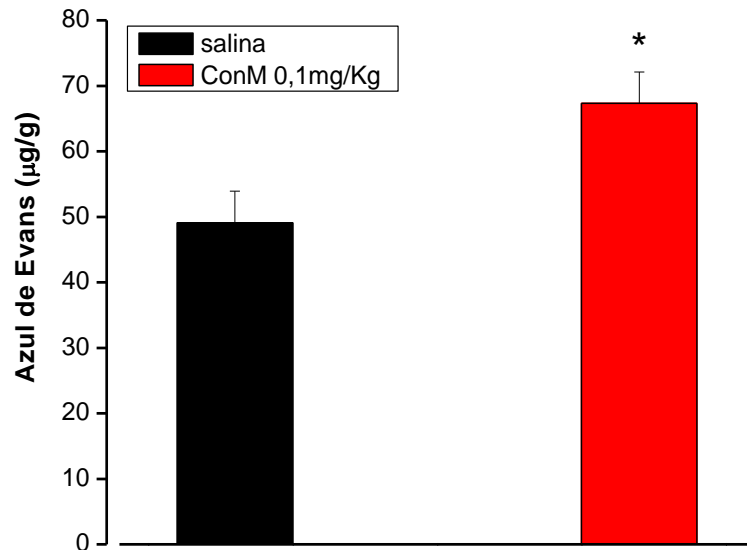


Figura 8. A lectina de *Canavalia maritima* induz aumento de permeabilidade vascular. Os animais receberam a lectina de *C. maritima* (ConM; 0,1 mg/Kg) ou salina (0,1 mL/Kg) por via intraplantar (s.c.). Os animais receberam azul de Evans (25 mg/Kg, e.v.), 30min. antes da lectina e o sacrifício foi realizado 1h após o azul de Evans. Média \pm E.P.M (μg de azul de Evans/g de pata) de 6 ratos. * $p < 0,05$ em relação a Salina.

7.3 PARTICIPAÇÃO DO DOMÍNIO LECTÍNICO NA ATIVIDADE EDEMATOGÊNICA DA LECTINA DE *Canavalia maritima*

A administração s.c. da ConM (0,1mg/Kg) associada ao seu açúcar ligante maltose (0,1M) reduziu ($42,7 \pm 12,7$; ASC) significativamente o efeito edematogênico produzido pela lectina sozinha ($90,2 \pm 4,7$; ASC), em cerca de 48%, durante todo o curso temporal do edema, retornando a valores próximos do grupo salina. Por outro lado, a administração s.c. de maltose, utilizada como controle, não apresentou ação edematogênica *per se* ($23,7 \pm 13,0$; ASC), também com valores próximos do grupo salina ($18,7 \pm 2,1$; ASC) (Figura 9a, b). Estes dados demonstram que a atividade edematogênica da ConM envolve em parte a via de reconhecimento de carboidratos.

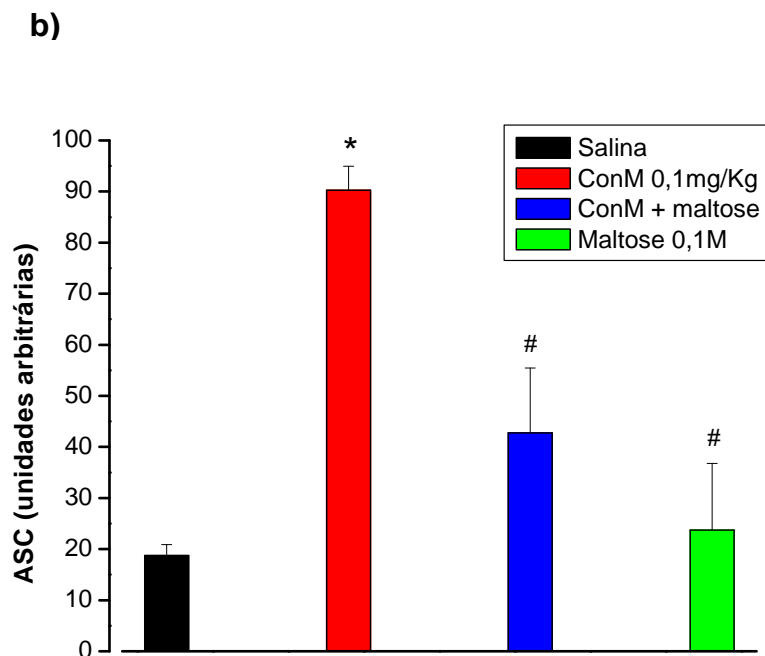
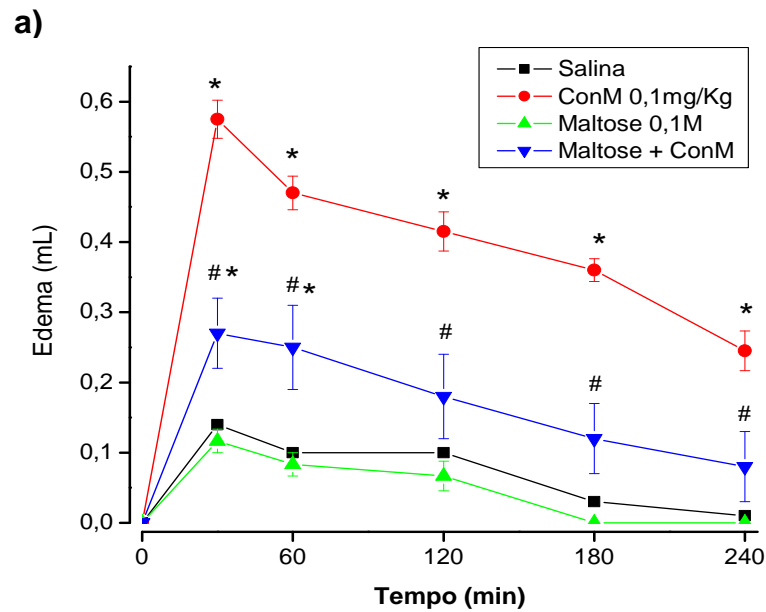


Figura 9. O efeito edematogênico da lectina de *Canavalia maritima* é inibido pela associação lectina e maltose. A lectina de *C. maritima* (ConM; 0,1 mg/Kg) foi administrada por via intraplantar (s.c.) sozinha ou em associação a maltose (0,1M). Os controles receberam salina estéril ou maltose. a) variação do volume da pata (mL) entre os vários tempos e o tempo zero; b) área sob a curva (ASC) determinada pelo método do trapézio. Média \pm E.P.M. de 6 ratos. * $p < 0,05$ comparado a salina; # $p < 0,05$ comparado a ConM sozinha.

7.4 O EFEITO EDEMATOGÊNICO DA LECTINA DE *Canavalia maritima* ENVOLVE A PARTICIPAÇÃO DE VÁRIOS MEDIADORES DA INFLAMAÇÃO

O pré-tratamento dos animais com os bloqueadores farmacológicos meclizina (anti-histamínico H1), pentoxifilina (inibidor de $\text{TNF}\alpha$ e IL1), indometacina (inibidor de prostaglandinas) e ácido niflúmico (inibidor de prostaglandinas e de canais de cloreto), mas não com o L-NAME (inibidor da síntese de óxido nítrico) reduziu a atividade edematogênica da ConM (0,1 mg/kg; s.c.) (Figura 10-14). A meclizina foi o bloqueador que apresentou melhor inibição da resposta edematogênica da ConM.

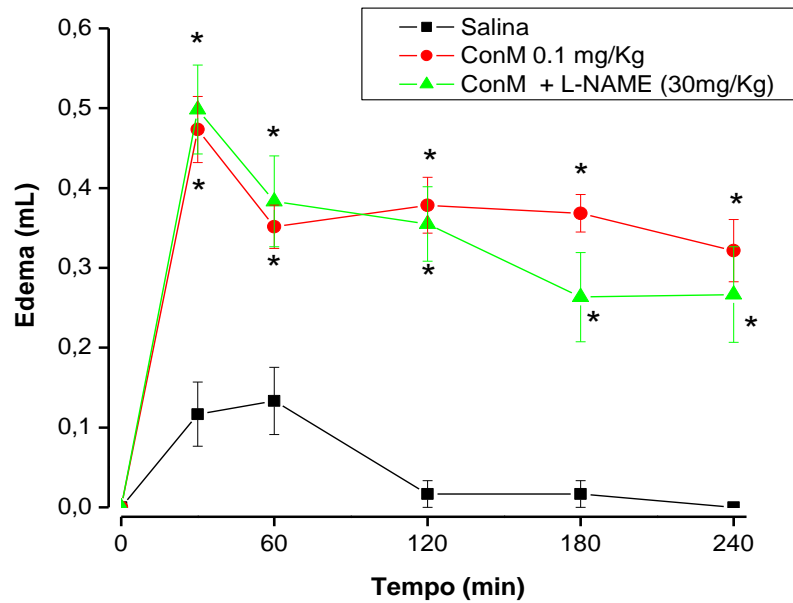
O efeito edematogênico da ConM ($84,4 \pm 2,6$; ASC) não foi inibido pelo pré-tratamento dos animais com L-NAME ($77,3 \pm 11,9$; ASC) em nenhum dos tempos avaliados. Esses dados excluem a participação do NO neste efeito (Figura 10a, b). Por outro lado, o bloqueador meclizina reduziu de forma significativa, em cerca de 55,3% ($38,8 \pm 6,2$; ASC) o edema provocado pela ConM ($87,2 \pm 5,3$; ASC) já a partir dos primeiros 30 min, até a terceira hora de seu desenvolvimento (Figura 11a, b). Com isto, pode-se sugerir a importante participação da histamina na resposta edematogênica elicitada pela lectina. A pentoxifilina, inibidor de citocinas primárias (IL-1 e $\text{TNF}\alpha$), reduziu em cerca de 37,2% ($54,9 \pm 4,5$; ASC) o edema provocado pela ConM ($87,2 \pm 5,3$; ASC) em todo o seu curso temporal (Figura 12a, b). Esses dados sugerem a participação destas citocinas primárias no efeito edematogênico da ConM.

Somado a estes mediadores, observa-se também a participação de prostaglandinas no efeito edematogênico da ConM. A indometacina, inibidor não seletivo de ciclooxigenase, reduziu de forma significativa, em cerca de 36,7% ($56,5 \pm 10,8$; ASC) o edema provocado pela lectina ($88,1 \pm 10,3$; ASC), embora apenas a partir da segunda hora do curso temporal do edema, mas mantendo esta redução até o desaparecimento do mesmo (Figura 13a, b). A participação de canais de cloreto também foi investigada. O ácido niflúmico (NFA), bloqueador dual de prostaglandinas e canais de cloreto, reduziu em 49,1% ($40,4 \pm 5,7$; ASC) o edema provocado pela ConM ($78,9 \pm 5,2$; ASC) durante todo o seu curso temporal (Figura 14a, b). A atividade inibitória residual de 12,4%: 49,1% (inibição por NFA) - 36,7% (inibição por

indometacina) indica a menor participação de canais de cloreto e numa fase mais precoce com relação às prostaglandinas no edema provocado pela ConM.

Observa-se pela análise da Tabela 1 que a lectina de *C. maritima* induz a formação de edema de pata com liberação de vários mediadores inflamatórios de acordo com o curso temporal a seguir: histamina, dos trinta minutos até a terceira hora; citocinas (IL-1 e $TNF\alpha$), durante todo o curso temporal; prostaglandinas, a partir da segunda hora. A participação dos canais de cloreto (efeito residual subtraído da inibição por indometacina) foi analisada artificialmente, não tendo sido possível fazer a estatística. Apesar disso, vê-se claramente que a participação destes canais é mais importante na fase precoce do edema induzido pela ConM, período no qual ainda não havia sido detectado a presença de prostaglandinas.

a)



b)

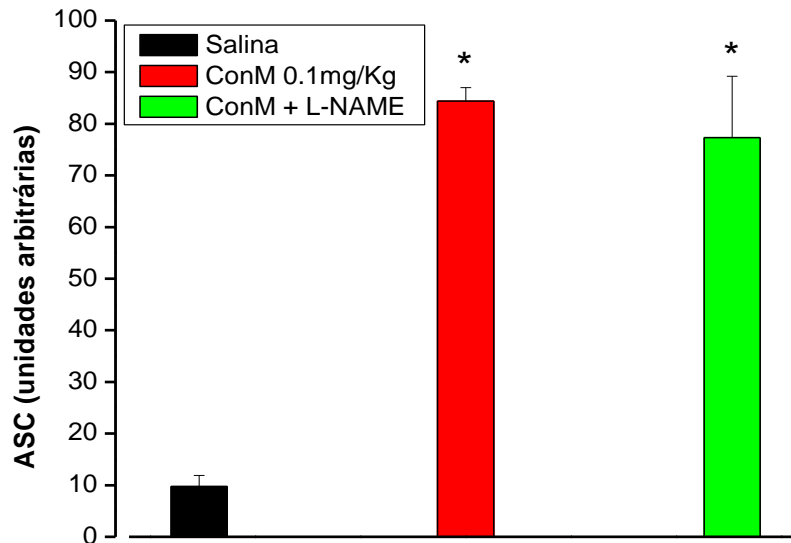


Figura 10. L-NAME não inibe o edema de pata induzido pela lectina de *Canavalia maritima*. Os animais receberam L-NAME (30mg/kg; e.v.) 1h antes da lectina de *C. maritima* (ConM; 0,1 mg/Kg; s.c.). a) variação do volume da pata (mL) entre os vários tempos e o tempo zero; b) área sob a curva (ASC) determinada pelo método do trapézio. Média \pm E.P.M. de 6 ratos. * $p < 0,05$ comparado a Salina.

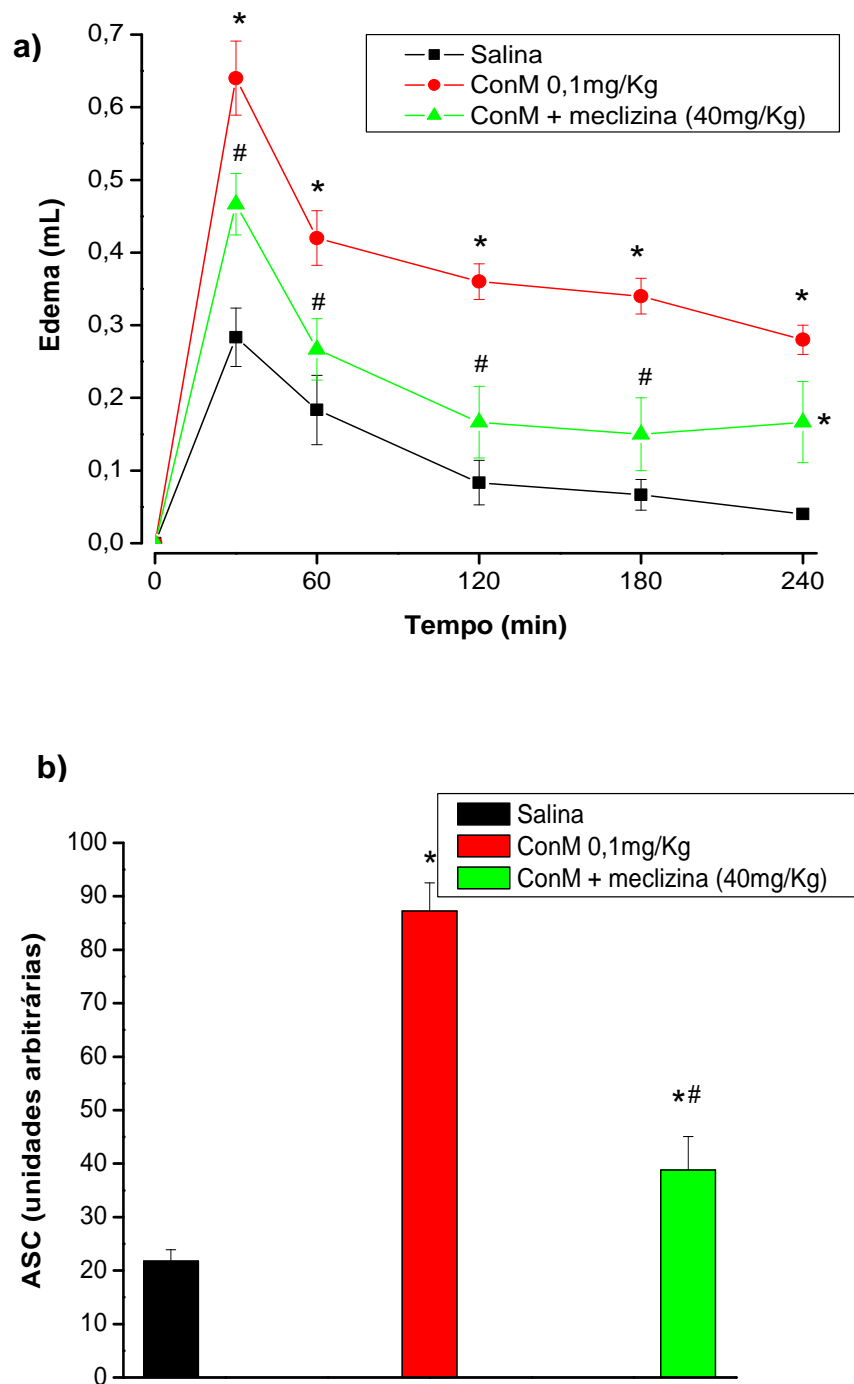


Figura 11. Meclizina inibe o edema de pata induzido pela lectina de *Canavalia maritima*. Os animais receberam meclizina (40mg/kg; s.c.), 30 min antes da lectina de *C. maritima* (ConM; 0,1 mg/Kg; s.c.). a) variação do volume da pata (mL) entre os vários tempos e o tempo zero; b) área sob a curva (ASC) determinada pelo método do trapézio. Média \pm E.P.M. de 6 ratos. * $p < 0,05$ comparado a Salina; # $p < 0,05$ em relação a ConM.

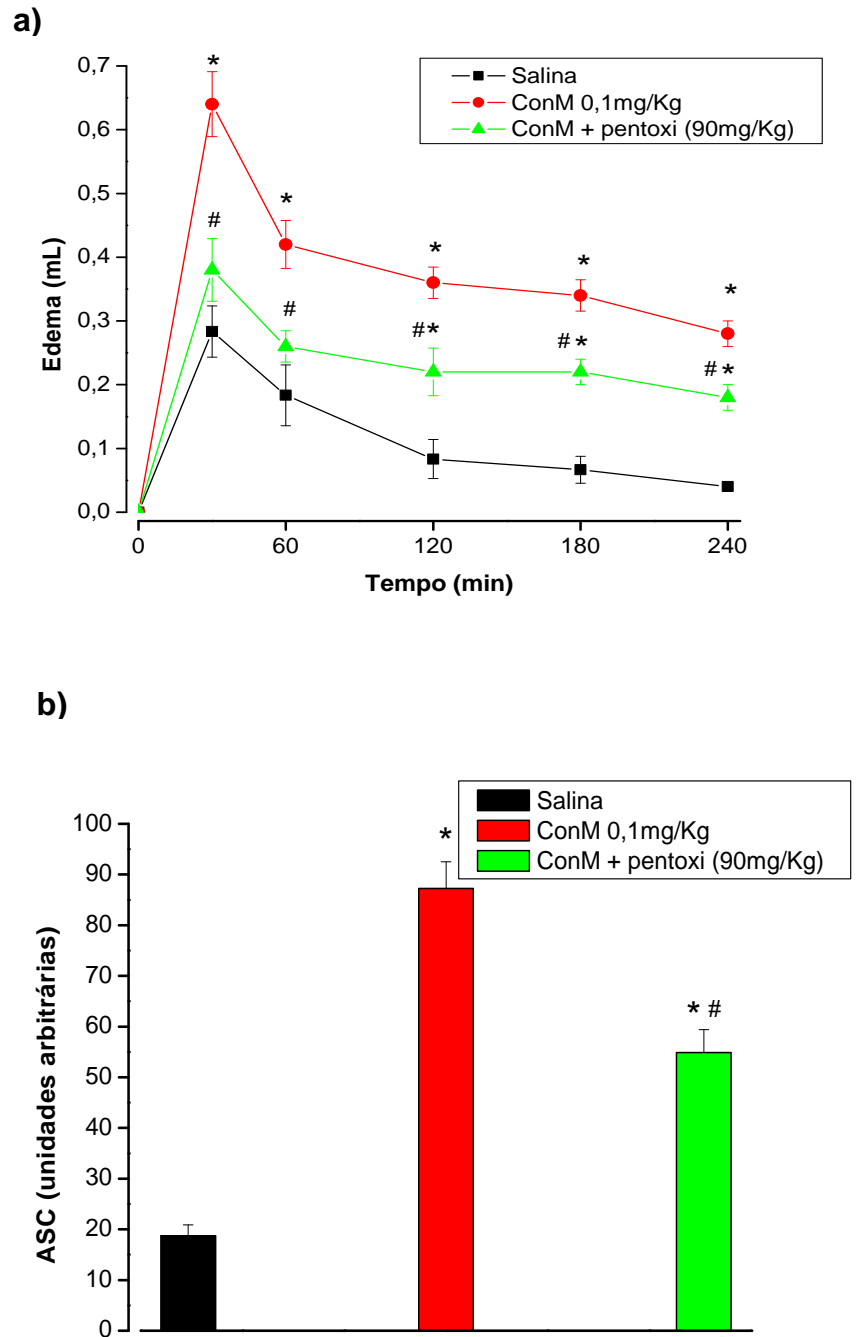


Figura 12. Pentoxifilina inibe o edema de pata induzido pela lectina de *Canavalia maritima*. Os animais receberam pentoxifilina (90mg/kg; s.c.), 1 h antes da lectina de *C. maritima* (ConM; 0,1 mg/Kg; s.c.). a) variação do volume da pata (mL) entre os vários tempos e o tempo zero; b) área sob a curva (ASC) determinada pelo método do trapézio. Média \pm E.P.M. de 6 ratos. * $p < 0,05$ comparado a Salina; # $p < 0,05$ em relação à ConM.

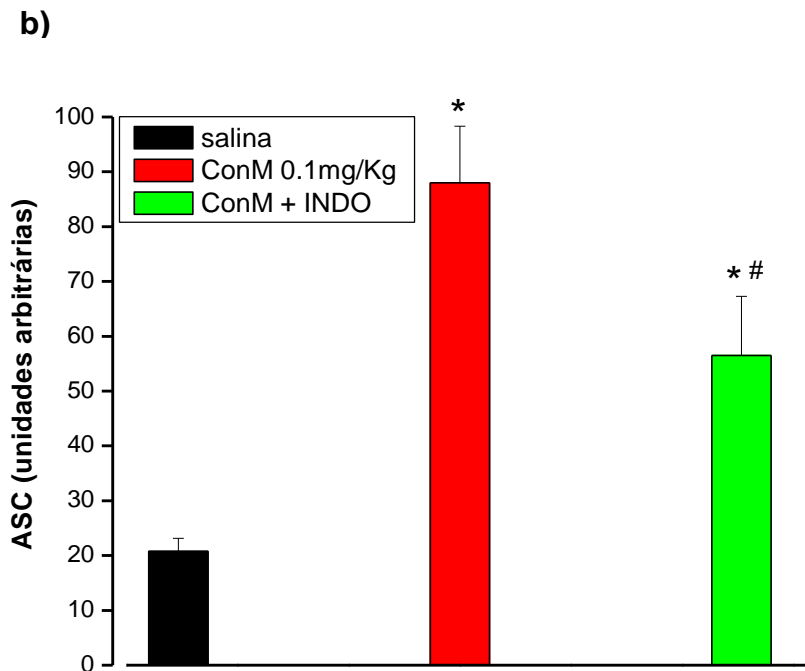
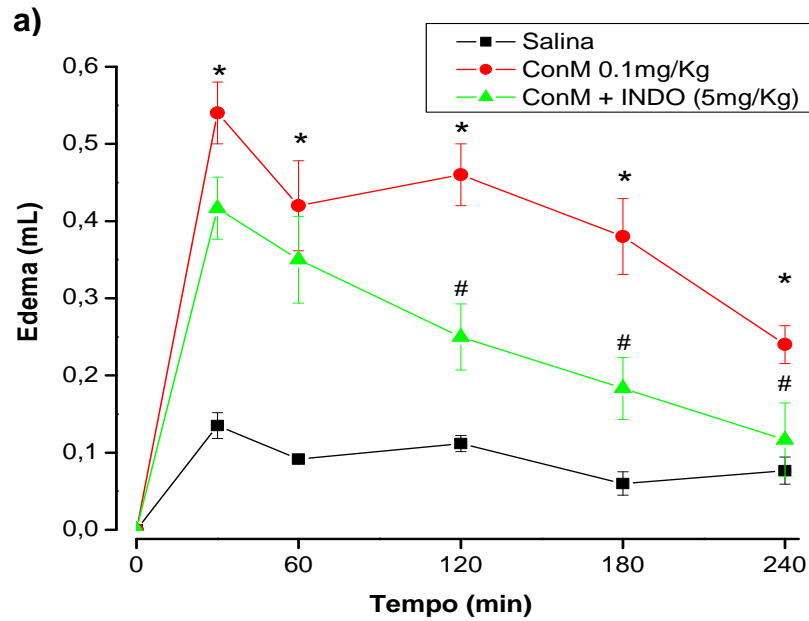
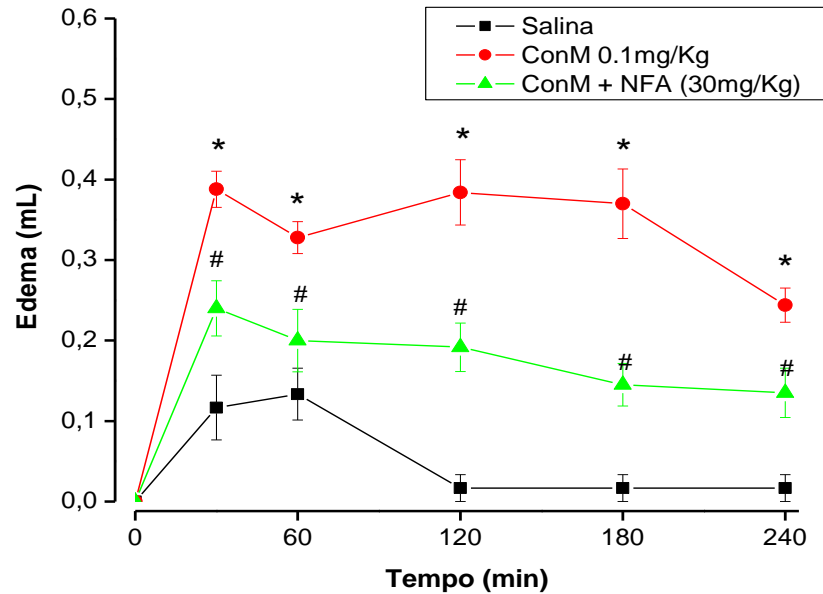


Figura 13. Indometacina inibe o edema de pata induzido pela lectina de *Canavalia maritima*. Os animais receberam indometacina (5mg/kg; s.c.), 1 h antes da lectina de *C. maritima* (ConM; 0,1 mg/Kg; s.c.). a) variação do volume da pata (mL) entre os vários tempos e o tempo zero; b) área sob a curva (ASC) determinada pelo método do trapézio. Média \pm E.P.M. de 6 ratos. * $p < 0,05$ comparado a Salina; # $p < 0,05$ em relação à ConM.

a)



b)

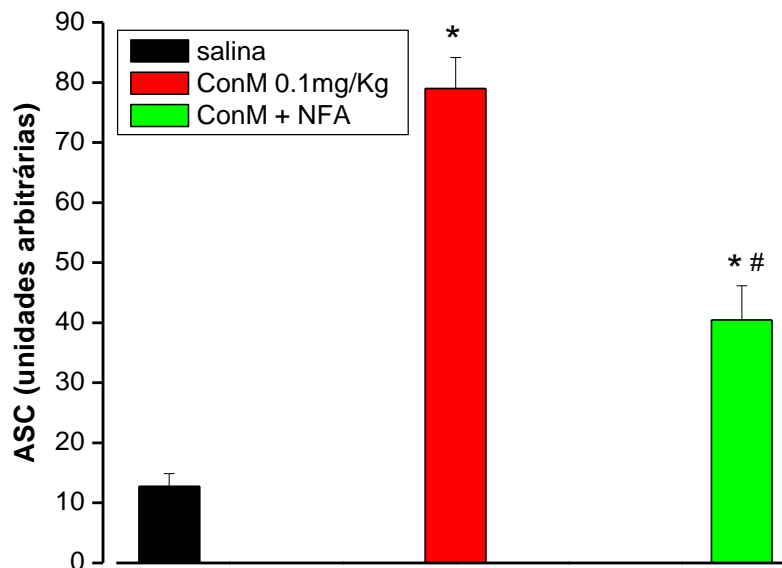


Figura 14. NFA inibe o edema de pata induzido pela lectina de *Canavalia maritima*. Os animais receberam NFA (30mg/kg; i.p.), 1 h antes da lectina de *C. maritima* (ConM; 0,1 mg/Kg; s.c.). a) variação do volume da pata (mL) entre os vários tempos e o tempo zero; b) área sob a curva (ASC) determinada pelo método do trapézio. Média \pm E.P.M. de 6 ratos. * $p < 0,05$ comparado a Salina; # $p < 0,05$ em relação à ConM.

Tabela 1. Inibição do curso temporal do edema induzido pela lectina de *Canavalia maritima* por bloqueadores farmacológicos.

Bloqueadores	Tempo (min.)				
	30	60	120	180	240
L-NAME	0	0	8	30	16
Meclizina	*27	*36	*53	*56	39
Pentoxifilina	*41	*38	*39	*35	*36
Indometacina	26	17	*47	*53	*50
NFA	*38	*40	*50	*59	*46
NFA subtraído da Indometacina	12	23	3	6	4

Os valores (%) foram calculados sobre as medidas do volume das patas (mL) com edema induzido pela ConM (0,1mg/Kg; s.c.; controle positivo) em relação aos pré-tratados s.c. com os bloqueadores. * $p < 0,05$ comparado ao controle positivo.

7.5 EFEITO INIBITÓRIO DA LECTINA DE *Canavalia maritima* SOBRE O EDEMA DE PATA EM RATOS INDUZIDO POR CARRAGENINA E DEXTRANA

A injeção subcutânea intraplantar de carragenina (2 mg/pata) em ratos promoveu intenso edema de pata ($200,9 \pm 12,7$; ASC) que atingiu efeito máximo na 2^a h após a injeção, o qual foi mantido elevado até a 4^a h de seu desenvolvimento. O pré-tratamento e.v. dos animais com a ConM (0,01; 0,1 e 1 mg/kg), 30 min antes da administração de carragenina, reduziu significativamente em cerca de 43% ($113,9 \pm 10,5$; ASC) todo o curso temporal de formação do edema, embora somente na dose de 1mg/kg (Figura 15a, b).

A injeção subcutânea intraplantar de dextrana 300 μ g/pata promoveu intenso edema de pata ($240,7 \pm 16,0$; ASC) com atividade máxima após 30 min de sua administração. O tratamento prévio da ConM (1 mg/kg; e.v.), 30 min antes da dextrana,

inibiu significativamente o edema em aproximadamente 27% ($176,3 \pm 12,4$; ASC) durante todo o seu desenvolvimento (Figura 16a, b).

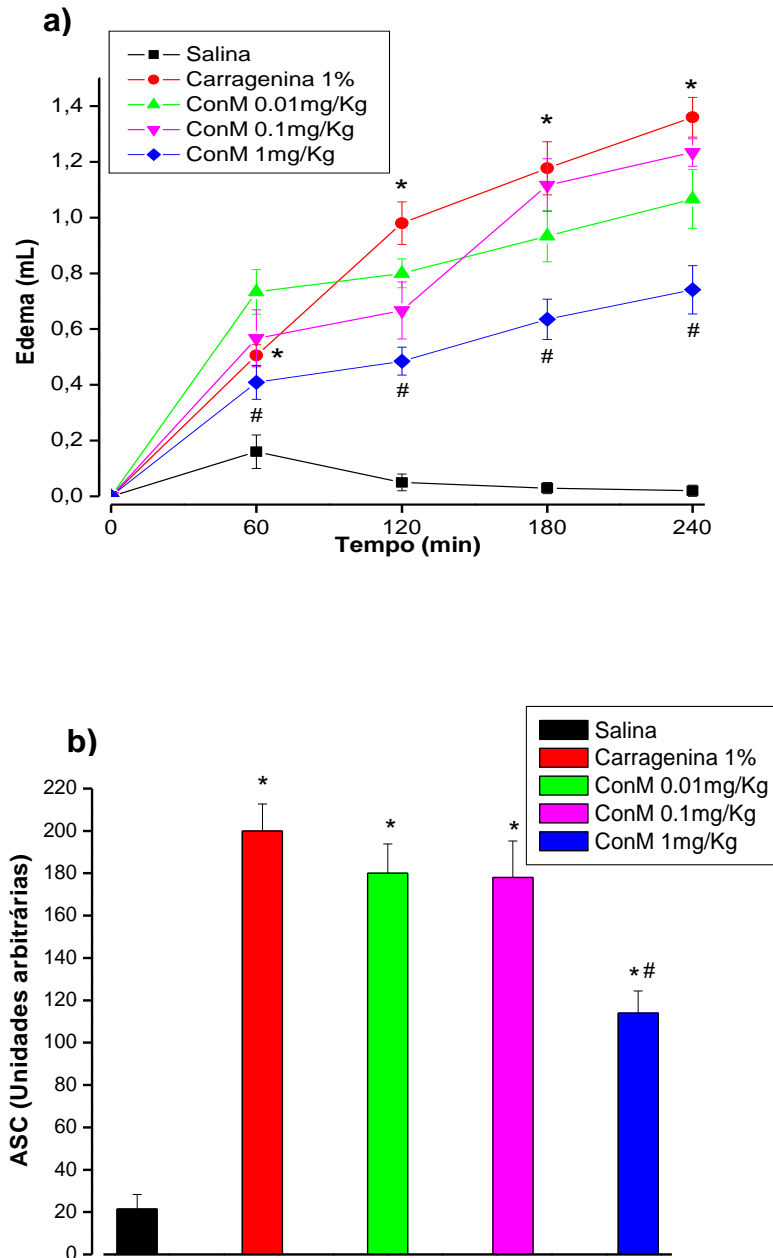
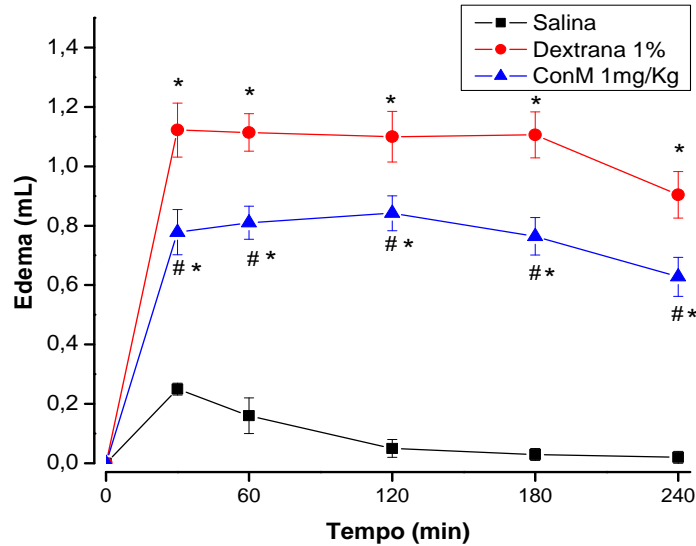


Figura 15. A lectina de *Canavalia maritima* inibe o edema de pata induzido por carragenina em ratos. A lectina de *C. maritima* (ConM; 0,01; 0,1 e 1mg/kg; e.v.) foi administrada 30min antes da carragenina (2mg/pata; s.c.). O grupo controle positivo recebeu apenas carragenina e o controle negativo salina (0,1ml/100g; s.c.). a) variação do volume da pata (mL) entre os vários tempos e o tempo zero; b) área sob a curva (ASC) determinada pelo método do trapézio. Média \pm E.P.M. de 6 ratos. * $p < 0,05$ comparado a Salina; # $p < 0,05$ em relação à carragenina.

a)



b)

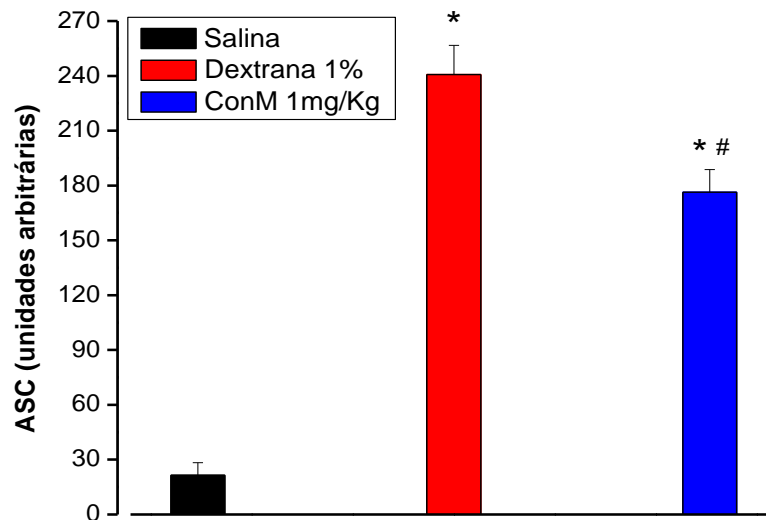


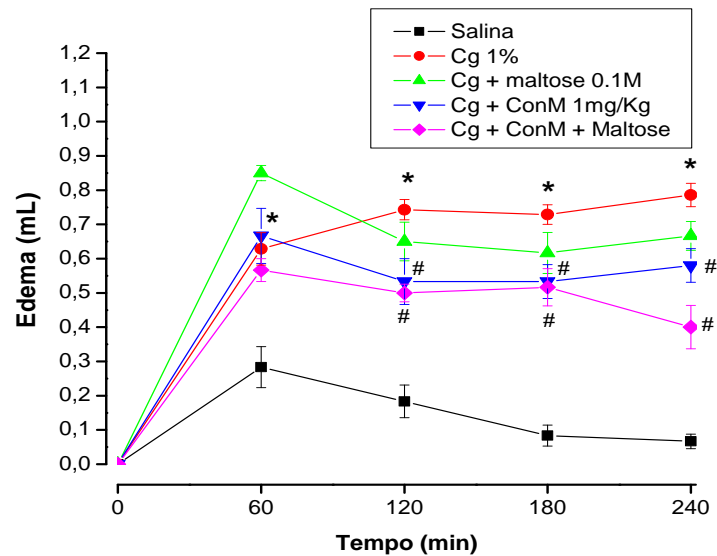
Figura 16. A lectina de *Canavalia maritima* inibe o edema de pata induzido por dextrana em ratos. A lectina de *C. maritima* (ConM; 0,01; 0,1 e 1mg/kg; e.v.) foi administrada 30min antes da dextrana (1%; s.c.). O grupo controle positivo recebeu apenas dextrana e o controle negativo salina (0,1ml/100g; s.c.). a) variação do volume da pata (mL) entre os vários tempos e o tempo zero; b) área sob a curva (ASC) determinada pelo método do trapézio. Média \pm E.P.M. de 6 ratos. * $p < 0,05$ comparado a Salina; # $p < 0,05$ em relação à dextrana.

7.6 A ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA DA LECTINA DE *Canavalia maritima* NÃO ENVOLVE A PARTICIPAÇÃO DO DOMÍNIO LECTÍNICO

O efeito antiinflamatório da ConM ($129,1 \pm 12,6$; ASC) sobre o edema de pata induzido por carragenina não foi alterado pelo pré-tratamento e.v. dos animais com a lectina associada a seu açúcar ligante maltose em solução incubada à 37°C *overnight* ($110,5 \pm 6,6$; ASC). Como esperado, a maltose, administrada sozinha, 30 min antes da carragenina não apresentou efeito *per se* sobre o desenvolvimento do edema ($156,0 \pm 9,2$; ASC) (Figura 17a, b). Este resultado sugere que o efeito antiinflamatório da ConM sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos não envolve o sítio lectínico.

A lectina de *C. maritima* (ConM; 1 mg/Kg) foi administrada por via intrapeniana (e.v.) sozinha ou em associação a maltose (0,1M) 30min antes da carragenina (2mg/pata; s.c.). Os controles receberam Cg ou salina estéril. a) variação do volume da pata (mL) entre os vários tempos e o tempo zero; b) área sob a curva (ASC) determinada pelo método do trapézio. Média \pm E.P.M. de 6 ratos. * $p < 0,05$ comparado a salina; # $p < 0,05$ comparado a Cg.

a)



b)

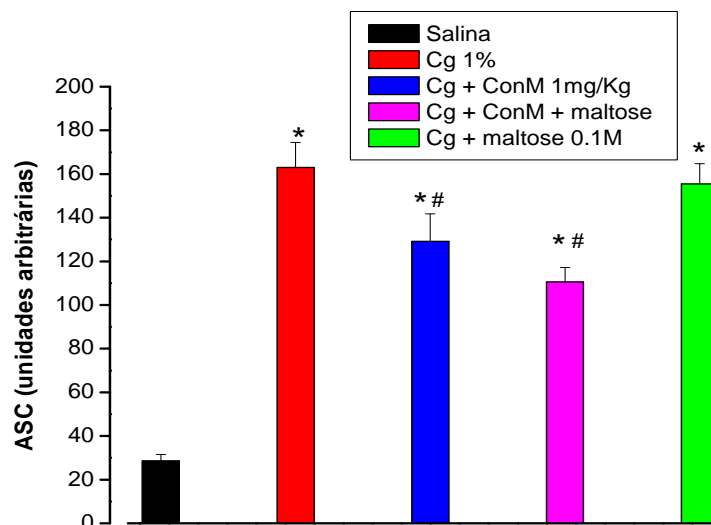


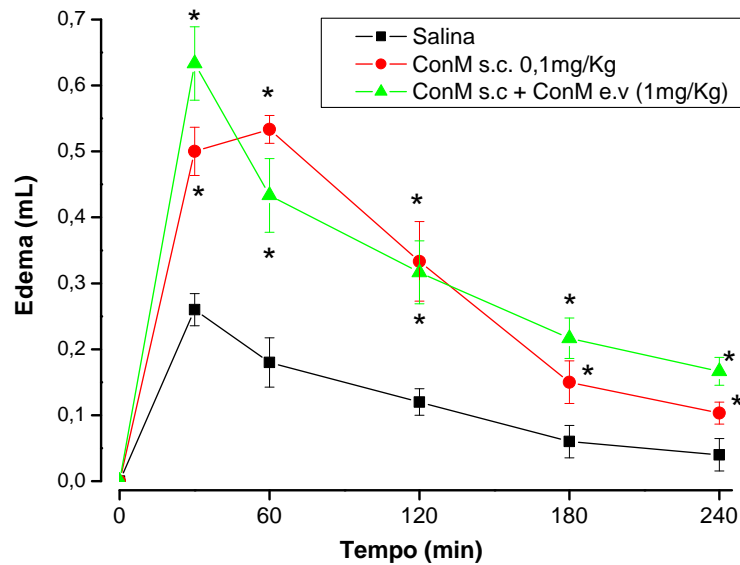
Figura 17. O efeito antiedematogênico da lectina de *Canavalia maritima* sobre o edema de pata induzido por carragenina não envolve a participação do domínio lectínico. A lectina de *C. maritima* (ConM; 0,01; 0,1 e 1mg/kg; e.v.) foi administrada 30min antes da carragenina (1%; s.c.). O grupo controle positivo recebeu apenas carragenina e o controle negativo salina (0,1ml/100g; s.c.). a) variação do volume da pata (mL) entre os vários tempos e o tempo zero; b) área sob a curva (ASC) determinada pelo método do trapézio. Média \pm E.P.M. de 6 ratos. * $p < 0,05$ comparado a Salina; # $p < 0,05$ em relação à carragenina.

7.7 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO ENDOVENOSO DA LECTINA DE *Canavalia maritima* SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR ELA PRÓPRIA EM RATOS

A administração endovenosa da ConM (1mg/kg) 30 min antes da administração local (s.c. intraplantar) da própria lectina em ratos não alterou seu efeito edematogênico. Esses resultados sugerem que os mecanismos das atividades antiinflamatória e pró-inflamatória desta lectina podem seguir uma rota diferente de ativação ou inativação de mediadores inflamatórios (Figura 18a, b).

A lectina de *C. maritima* (ConM; 1mg/kg; e.v.) foi administrada 30min antes dela própria (1mg/kg; s.c.; intraplantar.). O grupo controle positivo recebeu apenas ConM e o controle negativo salina (0,1ml/100g; s.c.). a) variação do volume da pata (mL) entre os vários tempos e o tempo zero; b) área sob a curva (ASC) determinada pelo método do trapézio. Média \pm E.P.M. de 6 ratos. * $p < 0,05$ comparado a Salina; # $p < 0,05$ em relação à ConM.

a)



b)

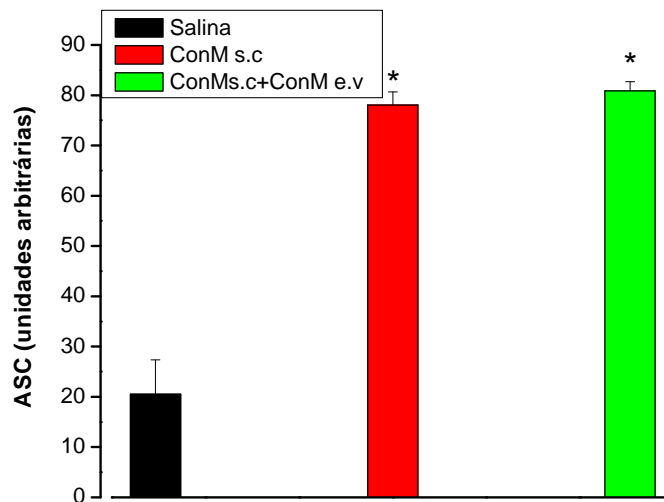
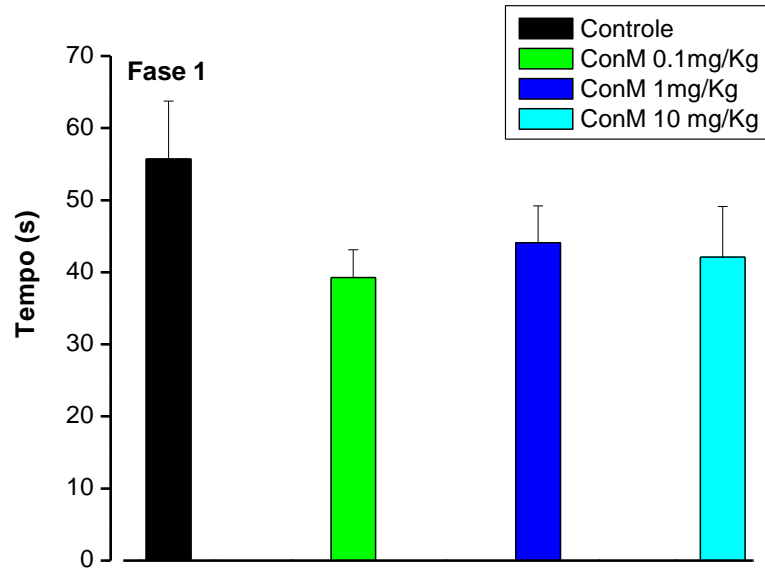


Figura 18. A lectina de *Canavalia maritima* não inibe o edema de pata provocado por ela própria em ratos. ConM (1mg/kg) foi administrada por via e.v. intrapeniana 30 min antes dos animais serem tratados com a própria ConM(1mg/kg; s.c.; intraplantar). O grupo controle positivo recebeu apenas ConM (s.c.) e o controle negativo salina (0,1ml/100g; s.c.). a) variação do volume da pata (mL) entre os vários tempos e o tempo zero; b) área sob a curva (ASC) determinada pelo método do trapézio. Média \pm E.P.M. de 6 ratos. * $p < 0,05$ comparado a Salina; # $p < 0,05$ em relação à ConM.

7.8 A LECTINA DE *Canavalia maritima* APRESENTA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA NA FASE INFLAMATÓRIA DO TESTE DA FORMALINA EM CAMUNDONGOS

Formalina (1,2%) administrada por via intraplantar produziu um aumento no tempo de lambida da pata somente na segunda fase (20-25 min; inflamatória) do teste. Esses valores foram de $56,0 \pm 8,0$ e $210,6 \pm 8,1$ segundos, respectivamente. A lectina de *C. maritima* (0,1; 1 e 10mg/Kg; e.v.) reduziu de forma significativa o tempo de lambida da pata somente na fase inflamatória do teste. Nesta fase, a nocicepção induzida por formalina ($210,6 \pm 17,6$ s) foi reduzida pela lectina nas doses de 1mg/Kg ($86,0 \pm 11,3$ s) e 10 mg/Kg ($96,7 \pm 7,0$ s) em cerca de 59% e 54%, respectivamente, mas não na dose de 0,1 mg/Kg (Figura 19a, b).

a)



b)

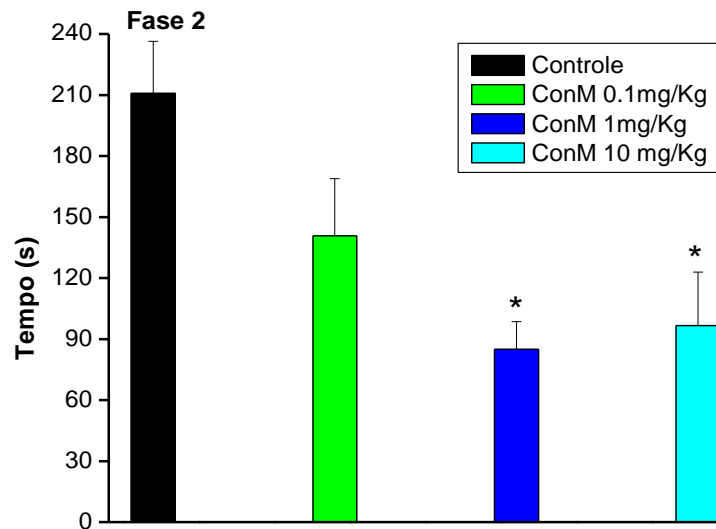


Figura 19. A lectina de *Canavalia maritima* inibe a fase inflamatória do teste de formalina em camundongos. A nocicepção foi mensurada imediatamente após injeção intraplantar de formalina (1,2%) nos tempos de 0-5 min (fase neurogênica) e 25-30 min (fase inflamatória). ConM (0,1; 1 e 10 mg/kg; i.v.) foram administrados 15 min. antes da formalina. O grupo controle recebeu apenas formalina. Os resultados são expressos com média \pm E.P.M. do tempo de lambertura (s) (n=6). * $p < 0.05$ comparado ao grupo controle (salina); ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni.

7.9 EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO COM A LECTINA DE *Canavalia maritima* EM RATOS

A ConM injetada em dose única (1mg/kg; e.v.; veia caudal) durante sete dias consecutivos não provocou alterações significantes no peso corporal dos animais ou dos órgãos avaliados (baço, coração, fígado e rim), comparado ao grupo controle injetado com salina. A avaliação macroscópica demonstrou morfologia normal e ausência de edema em todos os órgãos (Tabela 2), tendo o estômago demonstrado mucosas intactas, sem grau de lesão visível.

O número de leucócitos circulantes no sangue (leucograma) dos animais tratados com a lectina também não foi afetado significativamente em relação ao controle, sugerindo que esta proteína não promoveu aglutinação de leucócitos ou efeitos secundários nos tecidos linfóides, mantendo preservado o número de células de defesa (Tabela 3).

A dosagem de uréia e creatinina utilizadas como parâmetro de avaliação renal não foram diferentes significativamente do controle. O mesmo ocorreu com as atividades cinéticas das enzimas hepáticas (aspartato amino transferase e alanina amino transferase) sugerindo o funcionamento normal do rim e fígado, respectivamente. Quanto as proteínas plasmáticas, albumina e globulina, foram avaliadas a fim de verificar a manutenção do equilíbrio osmótico e também não foram diferentes significativamente do controle(Tabela 4).

Esses resultados sugerem que a ConM apresenta uma excelente tolerância pelos animais, uma vez que o tratamento agudo não provocou alteração em nenhum dos parâmetros descritos.

Tabela 2. O tratamento de ratos com a lectina de *Canavalia maritima* não altera o peso corporal dos animais e o peso úmido de seus órgãos. Legendas: ^(a) ratos foram injetados e.v. em dose única diária durante 7 dias; ^(b) após o tratamento, os animais foram pesados, sacrificados e seus órgãos removidos e pesados ainda úmidos; ^(c) Média \pm E.P.M. (n=7).

^b Peso corporal (g) e de órgãos (g/100g peso corporal)	^a TRATAMENTO (100 μ l/100g)	
	SALINA (0,9%)	ConM (1mg/Kg)
Peso corporal antes	^c 160,00 \pm 7,7	166,80 \pm 7,1
Peso corporal depois	175,00 \pm 8,1	181,70 \pm 9,8
Fígado	7,25 \pm 0,82	6,35 \pm 0,42
Rim	0,66 \pm 0,08	0,69 \pm 0,04
Coração	0,67 \pm 0,03	0,61 \pm 0,10
Baço	0,53 \pm 0,06	0,55 \pm 0,08

Tabela 3. Tratamento de ratos com a lectina de *Canavalia maritima* não altera o leucograma dos animais. Legendas: (^a) ratos foram injetados e.v. em dose única diária durante 7 dias; (^b) após o tratamento, os animais foram pesados, sacrificados e seus órgãos removidos e pesados ainda úmidos; (^c) Média \pm E.P.M. (n=7).

^b Leucograma (%)	^a TRATAMENTO (100 μ l/100g)	
	SALINA (0,9%)	ConM (1mg/Kg)
Contagem total	^c 6,22 \pm 1,24	5,82 \pm 1,20
Neutrófilos	26,47 \pm 10,55	42,00 \pm 18,48
Eosinófilos	1,48 \pm 0,41	1,75 \pm 1,15
Basófilos	0,48 \pm 0,48	2,15 \pm 3,35
Monócitos	0,70 \pm 0,42	0,57 \pm 0,19
Linfócitos	70,87 \pm 10,27	53,51 \pm 16,17

Tabela 4. O tratamento de ratos com a lectina de *Canavalia maritima* não altera o padrão de vários parâmetros bioquímicos. Legendas: ^(a) ratos foram injetados e.v. em dose única diária durante 7 dias; ^(b) após o tratamento, os animais foram pesados, sacrificados e seus órgãos removidos e pesados ainda úmidos; ^(c) Média \pm E.P.M. (n=7).

^b Dosagens bioquímicas	^a TRATAMENTO (100 μ l/100g)	
	SALINA (0,9%)	ConM (1mg/Kg)
Uréia (mg/dl)	^c 54,55 \pm 6,68	57,25 \pm 7,19
Creatinina (mg/dl)	0,63 \pm 0,07	0,56 \pm 0,12
AST (U/L)	146,80 \pm 11,60	183,67 \pm 18,34
ALT (U/L)	32,00 \pm 4,51	23,80 \pm 3,72
Proteínas totais (g/dl)	6,94 \pm 0,31	6,97 \pm 0,12
Albumina (mg/dl)	4,60 \pm 0,15	4,10 \pm 0,09
Globulina (mg/dl)	2,34 \pm 0,26	2,82 \pm 0,08

8 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a lectina da leguminosa *Canavalia maritima* (ConM) administrada por via subcutânea intraplantar em ratos apresenta efeitos pró-inflamatórios e por via endovenosa caudal, efeitos antiinflamatórios no modelo de edema de pata em ratos. A dose na qual a lectina estimulou a formação do edema de pata foi dez vezes menor com relação àquela com que produziu a atividade antiedematogênica.

Estes resultados corroboram outros trabalhos já publicados que estabelecem a associação entre as ações anti- ou pró-inflamatórias de lectinas vegetais com a via de administração utilizada. Quando injetadas localmente, lectinas vegetais apresentam atividades pró-inflamatórias e imunoestimulantes (BARRAL-NETO *et al.*, 1992; MACIEL *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 1994; ALENCAR *et al.*, 2003, 2004) e quando injetadas sistemicamente, apresentam ações antiinflamatórias (ASSREUY *et al.*, 1997, 1999; ALENCAR *et al.*, 1999; ALENCAR *et al.*, 2005; MOTA *et al.*, 2006; SANTI-GADELHA *et al.*, 2006, NAPIMOGA *et al.*, 2007).

Observando-se o curso temporal do efeito edematogênico da ConM, verificou-se que esta induziu edema de pata em todas as doses testadas com efeito máximo na primeira meia hora após sua administração e desaparecimento após a quarta hora. Estes dados demonstram que o processo inflamatório produzido pela lectina é característico de fase aguda e de natureza osmótica. De fato, outros achados da literatura sobre lectinas do gênero *Canavalia* são sugestivos de tal ação, a exemplo da formação do edema de pata induzido pela lectina de *C. brasiliensis* (BENTO *et al.*, 1993) e da liberação de histamina por mastócitos estimulados com lectinas de *C. brasiliensis* e *Canavalia ensiformis* (ConA) (GOMES *et al.*, 1994).

O edema de pata produzido pela ConM se apresenta tipicamente como um mecanismo de defesa, visto sua intensidade, de pelo menos 3 vezes inferior àquele produzido pela carragenina, um agente inflamatório clássico. Mais uma vez, os dados mostram-se compatíveis com a literatura no que se refere à sugestão de um efeito imunoestimulante.

Demonstrou-se ainda a capacidade da ConM em aumentar de maneira discreta a permeabilidade vascular nas patas inflamadas dos animais. Estes dados fortalecem o papel desta lectina como agente desencadeante da liberação de mediadores envolvidos em eventos vasculares do processo inflamatório, bem como confirmam seu efeito pró-inflamatório. Alterações de permeabilidade já haviam sido descritas *in vitro* em microvasculatura para uma lectina ligadora de N-acetil-D-glicosamina, cujo aumento de permeabilidade foi revertido por seu açúcar ligante (NORTHOVER; NORTHOVER, 1994). Entretanto, o efeito edematogênico produzido pela ConM foi superior ao aumento de permeabilidade, sugerindo-se que esta lectina pode estar ativando uma cascata de liberação de mediadores inflamatórios mais relacionados com a formação de edema em detrimento das alterações de permeabilidade.

A dextrana é um agente inflamatório conhecido por provocar a liberação de aminas vasoativas (histamina e serotonina) causando assim um edema osmótico, acelular caracterizado por aumento de permeabilidade vascular e presença dos mediadores histamina, serotonina, substância P e serotonina (BERSTAD, 1980; MOODLEY *et al.*, 1982; LO *et al.*, 1982). Por outro lado, a carragenina é uma substância caracterizada por elicitar a liberação temporal de vários mediadores inflamatórios. Na primeira fase libera aminas biogênicas, responsáveis pelo desenvolvimento dos eventos vasculares e numa segunda fase é mantida por outros mediadores, tais como prostaglandinas e óxido nítrico, responsáveis pelo desenvolvimento dos eventos celulares. A segunda fase do edema induzido pela carragenina é caracterizada pela presença de infiltrado celular intenso, com predominância de neutrófilos e produção de radicais livres derivados do oxigênio (DI ROSA *et al.*, 1971; MORRIS *et al.*, 2003).

Neste trabalho, o tratamento endovenoso de ratos com a ConM preveniu tanto o edema de pata produzido por dextrana quanto por carragenina, embora este último com maior intensidade. O efeito antiedematogênico da ConM, embora discreto, parece estar mais relacionado com os eventos celulares do processo inflamatório, ao contrário de sua ação vascular como indutor de edema. Além disso, o tratamento dos animais com a lectina durante sete dias não alterou a massa ponderal dos animais, o peso e a morfologia de órgãos importantes (rim, fígado, baço e coração), o leucograma,

as funções renal e hepática, bem como o equilíbrio osmótico. Outras lectinas de Diocleinae também influenciam negativamente eventos celulares da inflamação aguda em diferentes modelos experimentais (ASSREUY *et al.*, 1997, 1999; ALENCAR *et al.*, 1999).

Mostrou-se ainda que a ConM foi mais efetiva em inibir a fase tardia do teste da formalina do que a formação de edema. Este teste se constitui em duas fases que parecem envolver mediadores químicos diferentes. A primeira fase se credita à estimulação direta dos nociceptores com liberação de substância P, glutamato e bradicinina. A fase tardia, representada pela dor inflamatória, é desencadeada por uma combinação de estímulos que incluem inflamação nos tecidos periféricos e mecanismos de sensibilização espinhal e central (TJØLSEN *et al.*, 1992; TJØLSEN; HOLE, 1997), com o envolvimento de histamina, serotonina, prostaglandinas, NO e bradicinina (MALMBERG; YARSH, 1995; CORRÊA; CALIXTO, 1993; OMOTE *et al.*, 1998; SHIBATA *et al.*, 1989). Portanto, a inibição da fase tardia do teste da formalina pela ConM confirma sua atividade antiinflamatória no modelo de edema de pata. Conforme já descrito na literatura, drogas com efeitos centrais como a morfina e outros narcóticos, inibem ambas as fases do teste (HUNSKAAR *et al.*, 1985; SHIBATA *et al.*, 1989). Por outro lado, drogas antiinflamatórias (DAINES e dexametasona) inibem somente a formação ou a ação dos mediadores inflamatórios e nociceptivos da segunda fase da nocicepção induzida por formalina (SHIBATA *et al.*, 1989; CHEN *et al.*, 1995).

A participação do domínio lectínico na inflamação e nocicepção tem sido demonstrada para muitas ações de lectinas. A especificidade molecular dos leucócitos tendo como alvo os sítios de inflamação é mediada por lectinas de membranas (selectinas, integrinas e imunoglobulinas), que devido à correlação destas com os mecanismos de interação e adesividade entre diversas moléculas, leucócitos e células endoteliais, são conhecidas como moléculas de adesão (SIMON; GREEN, 2005). A adesão ao endotélio é um pré-requisito para a infiltração de neutrófilos no local da inflamação, processo mediado por selectinas, que através de seus domínios lectínicos reconhecem e interagem de forma específica com carboidratos de superfície. (ROBBINS *et al.*, 1994).

Vários trabalhos têm demonstrado a importância do sítio ligante à carboidratos na eliciação dos efeitos de lectinas na inflamação, sejam estes pró- (ALENCAR *et al.*, 2005a; 2005b; 2005c; FREIRE *et al.*, 2003) ou antiinflamatórios (ASSREUY *et al.*, 1997, 1999, ALENCAR *et al.*, 1999; 2005; SANTI-GADELHA *et al.*, 2006).

Neste trabalho, investigou-se o papel do sítio de reconhecimento a carboidrato (domínio lectínico) da ConM em seu efeito edematogênico e antiedematogênico pela associação da lectina a seu ligante manose. Observou-se que a administração local da ConM associada com manose aboliu seu efeito pró-inflamatório. Por outro lado, a administração sistêmica desta lectina em associação ao seu açúcar ligante, não aboliu seu efeito antiinflamatório. Estes dados sinalizam para a hipótese do envolvimento do domínio lectínico da ConM apenas na sua atividade edematogênica, ao contrário da lectina da *Gymnosperma Araucaria angustifolia*, cujo mecanismo de ação (anti- ou pró-edematogênicos) envolviam seu domínio lectínico (MOTA *et al.*, 2006).

Aprofundando o estudo do mecanismo de ação da ConM, demonstrou-se que esta lectina quando injetada sistemicamente nos animais não era capaz de inibir o edema de pata formado por ela própria por injeção local. Este resultado, somado ao da participação seletiva do domínio lectínico e da diferença de doses para a produção dos efeitos anti- ou pró-edematogênicos, sugere que as ações desta lectina no processo inflamatório se devam a mecanismos distintos.

Em função da potência 10 vezes maior da ConM em estimular a formação de edema de pata do que em inibi-lo, buscou-se investigar o(os) mediador(es) responsável(is) por este efeito.

Está bem demonstrada na literatura a participação do óxido nítrico no processo inflamatório (IALENTI *et al.*, 2000). Além disso, demonstramos em nosso laboratório, que o NO é o mediador responsável pelo efeito relaxante da lectina de *C. maritima* em aortas isoladas de ratos (GADELHA *et al.*, 2005). O L-NAME é uma substância reconhecida por inibir inespecificamente a atividade das isoformas da enzima óxido nítrico sintase, e com isto a produção de óxido nítrico (MONCADA,1991). No presente trabalho, o pré-tratamento dos animais com L-NAME não inibiu a formação

do edema de pata provocado pela ConM. Contrariando os resultados obtidos *in vitro* que sugeriam o NO como o mediador responsável pelo efeito vasorelaxante da ConM, os nossos resultados *in vivo* descartaram em definitivo a participação deste mediador no efeito vasodilatador desta lectina.

A meclizina é um antagonista de receptores H1 da histamina e a pentoxifilina é uma metilxantina que inibe a enzima fosfodiesterase, e com isso a síntese de citocinas hiperalgênicas e inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8) em diversos tipos celulares. Observa-se que o pré-tratamento dos animais tanto com meclizina quanto com pentoxifilina inibiu significativamente o edema induzido pela ConM, embora uma melhor inibição tenha sido observada para a meclizina. Estes dados sugerem uma melhor participação da histamina em detrimento de TNF- α e IL-1, confirmando a natureza osmótica do edema produzido pela ConM em função de sua atividade máxima aos trinta minutos. A participação de histamina oriunda de mastócitos peritoneais de ratos nas ações de lectinas vegetais (MOTA *et al.*, 2006), incluindo-se o gênero *Canavalia* (GOMES *et al.*, 1994), já tem sido demonstrada *in vivo* e *in vitro*. O envolvimento de TNF α também foi bem demonstrado tanto para lectinas de origem vegetal (ALENCAR *et al.*, 2006) quanto animal (ASSREUY *et al.*, 2003).

A indometacina é um inibidor não específico da atividade de ambas as isoformas da ciclooxigenase (COX-1 e COX-2), enzima responsável pela metabolização do ácido araquidônico com conseqüente produção de prostaglandinas (KANKURI *et al.*, 2001). O ácido niflúmico (NFA) é um inibidor dual de prostaglandinas e de canais de cloreto (COELHO *et al.*, 2004). Já é bem descrita a cascata de liberação de mediadores inflamatórios nos edemas elicitados por carragenina e dextrana, mas ainda não se tem dados sobre o edema da ConM. No nosso trabalho, a indometacina inibiu o efeito edematogênico induzido por esta lectina a partir da segunda hora, período correspondente ao surgimento de prostaglandinas no edema induzido por carragenina (Di ROSA *et al.*, 1971), o que sugere a participação de prostaglandinas neste edema. O ácido niflúmico inibiu o edema induzido pela lectina em uma fase mais precoce, desde os trinta minutos de seu desenvolvimento, do que aquela observada com a indometacina. Visto o efeito inibitório do ácido niflúmico em um período em que não há formação de prostaglandinas, sugere-se que a ConM desencadeie uma cascata de

ativação que se inicia com a participação de canais de cloreto e culmina com a de prostaglandinas. A literatura é omissa no que se refere a participação de prostaglandinas e canais de cloreto nas ações de lectinas sobre processos inflamatórios. Com relação aos canais de cloreto, sabe-se que estes são amplamente encontrados em uma variedade de músculos lisos vasculares em diferentes tipos celulares, mas pouco se conhece sobre a função de sua ativação nesses tecidos. Um estudo realizado em músculo liso vascular sugeriu que a aplicação de solução hipotônica extracelular pode ativar canais aniônicos, levando a despolarização mediada pela abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem e subsequente contração de aorta (Lang et al., 1995). Em nosso modelo experimental, pode-se especular que a formação de edema, aumento de extravasamento de líquidos (e/ou proteínas) e tonicidade do ambiente extravascular pela ConM possa estar provocando a ativação de canais de cloreto.

Os resultados obtidos nesse trabalho mostram que a lectina de *Canavalia maritima* possui atividade edematogênica, antiedematogênica e antinociceptiva, apresentando boa tolerância pelos animais. O fato de esta lectina ser um produto natural de fácil acesso abre perspectivas de sua utilização como ferramentas farmacológicas no estudo de condições inflamatórias, nociceptivas para o melhor entendimento dos processos inflamatórios auxiliando o desenvolvimento de novas drogas.

9 CONCLUSÕES

- A lectina de *Canavalia maritima* é anti-inflamatória, analgésica, bem tolerada pelos animais e a inibição do seu edema parece não depender do domínio lectínico.
- O seu edema é de natureza osmótica e parece ocorrer com participação do domínio lectínico. Ela também induz aumento de permeabilidade.
- A inflamação induzida pela lectina ocorre com participação de histamina, citocinas primárias (IL-1 e TNF- α), prostaglandinas e canais de cloreto.
- O fato da ConM não inibir seu próprio edema, somado a participação seletiva do domínio lectínico e da diferença de doses para a produção dos efeitos anti- ou pró-edematogênicos, sugere que as ações desta lectina no processo inflamatório se devam a mecanismos distintos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRAWAL, B.B.; GOLDSTEIN, I.J. Specific Binding of Concanavalin A to Cross-Linked Dextran Gels. **Biochem J**, v. 96, n. 3, p. 23-25, 1965.

ALENCAR, N.M.N.; TEIXEIRA, E.H.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S.; FLORES, C.A.; RIBEIRO, R.A. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediators Inflamm.**, v. 8, n. 2, p. 107-113, 1999.

ALENCAR, N.M.; ASSREUY, A.M.; ALENCAR, V.B.; MELO, S.C.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces in vivo neutrophil migration by indirect mechanism. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 35, n. 12, p. 1674-81, 2003.

ALENCAR, N.M.; ASSREUY, A.M.; CRIDDLE, D.N.; SOUZA, E.P.; SOARES, P.M.; HAVT, A.; ARAGÃO, K.S.; BEZERRA, D.P.; RIBEIRO, R.A.; CAVADA, B.S. *Vatairea macrocarpa* induces paw edema with leucocyte infiltration. **Protein Pept Lett**, v. 11, n. 2, 195-200, 2004.

ALENCAR, N.M.N.; CAVALCANTE, C.F.; VASCONCELOS, M.P.; LEITE, K.B.; ARAGÃO, K.S.; ASSREUY, A.M.S.; NOGUEIRA, N.A.P.; CAVADA, B.S.; VALE, M.R. Anti-inflammatory and anti-microbial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental model of infectious peritonitis. **J Pharm Pharmacol**, v. 57, n. 7, p. 919-922, 2005a.

ALENCAR, V.B.M.; ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; MOTA, M.L.; BRITO, G.A.C.; ARAGÃO, K.S.; BITENCOURT, F.S.; PINTO, V.P.T.; DEBRAY, H.; RIBEIRO, R.A.; CAVADA, B.S. Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. **Int. J Biochem Cell Biol**, v. 37, n. 9, p. 1805-1814, 2005b.

ALENCAR, V.B.M.; ASSREUY, A.M.S.; ALENCAR, N.M.N.; MEIRELES, A.V.P.; MOTA, M.R.L.; ARAGÃO, K.S.; CAJAZEIRAS, J.B.; NAGANO, C S.; BRITO, G A C; SILVA, L I M M; PINTO, V P T; SAMPAIO, A H; DEBRAY, H; CAVADA, B.S.; RIBEIRO, R.A. Lectin of *Pisum arvense* seeds induces in vivo and in vitro neutrophil migration. **J Pharm Pharmacol**, v. 57, n. 3, p. 375-381, 2005c.

Alencar, N.M.N; Oliveira, J. S.; Mesquita, R. O.; Lima, M.W.; Vale, M.R.; Etchells, J. P.; Freitas, C.D.T; M. V., Ramos. Pro- and anti-inflammatory activities of the latex from *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. are triggered by compounds fractionated by dialysis. **Inflamm res**, v. 55, n. 12, p. 559–564, 2006.

ALENCAR, N.M.; ASSREUY, A.M.; HAVT, A.; BENEVIDES, R.G.; MOURA, T.R.; SOUSA, R.B.; RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q.; CAVADA, B.S. Vaitarea macrocarpa (leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotactic mediators. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 374, n. 4, p. 275-282, 2007.

ALLEN, B.G.; WALSH, M.P. The biochemical basis of the regulation of smooth muscle contraction. **Trends Biochem Sci**, v. 19, n. 9, p. 362-368, 1994.

ANDRADE, J.L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; BARRAL-NETTO, M., Lectin-induced nitric oxide production. **Cell Immunol**, v. 194, n. 1, p. 98-102, 1999.

ANDRADE, C.A.; CORREIA, M.T.; COELHO, L.C.; NASCIMENTO, S.C.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **Int J Pharm.**, v. 278, n. 2, p. 435-45, 2004.

ASSREUY, A.M.S., SHIBUYA, M.D., MARTINS, G.J., SOUZA, M.L.P., CAVADA, B.S., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, J.T.A., RIBEIRO, R.A., FLORES, C.A. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators Inflamm**, v. 6, n. 3, p. 201-10, 1997.

ASSREUY, A.M.S., MARTINS, G.J., MOREIRA, E.E.F., BRITO, G.A.C., CAVADA, B.S., RIBEIRO, R.A., FLORES, C.A. Prevention of Cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. **J Urol**, v.161, n. 6, p. 1988-93, 1999.

ASSREUY, A.M.; ALENCAR, N.M.; CAVADA, B.S.; ROCHA-FILHO, D.R.; FEITOSA, R.F.; CUNHA, F.Q.; CALVETE, J.J.; RIBEIRO, R.A. Porcine spermadhesin PSP-I/PSP-II stimulates macrophages to release a neutrophil chemotactic substance: modulation by mast cells. **Biol Reprod**, v. 68, n. 5, p. 1836-41, 2003.

BALZARINI, J.; HATSE, S.; VERMEIRE, K.; PRINCEN, K.; AQUARO, S.; PERNO, C.F.; DE CLERCQ, E.; EGBERINK, H.; VANDEN MOOTER, G.; PEUMANS, W.; VAN DAMME E.; SCHOLS, D. Mannose-specific plant lectins from the Amaryllidaceae family qualify as efficient microbicides for prevention of human immunodeficiency virus infection. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 10, p. 3858-70, 2004.

BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T.B.; FREITAS, L.A.R.; BARRAL-NETTO, M. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p.673-78, 2001.

BARRAL-NETTO, M., SANTOS, S.B., BARRAL, A., MOREIRA, L.I.M., SANTOS, C.F., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, J.T.A., CAVADA, B.S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the *Diocleae* tribe. **Immun Invest**, v. 21, n. 4, p. 297-303, 1992.

BARRAL-NETTO, M.; VON SOHSTEN, R. L.; TEIXEIRA, M.; CONRADO DOS SANTOS, W. L.; POMPEU, M. L.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S.; FALCOFF, E.; BARRAL, A. *In vivo* protective effect of the lectin from *canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *leishmania amazonensis*. **Acta Trop**, v. 60, n. 4, p. 237-50, 1996.

BAUHMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Imunol today**, v. 15, n. 2, p. 74-80, 1994.

BECKER, J.W.; REEKE, G.N.J.R.; WANG, J.L.; CUNNINGHAM, B.A.; EDELMAN, G.M. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. III. Structure of the monomer and its interactions with metals and saccharides. **J Biol Chem**, v. 250, n. 4, p. 1513-24, 1975.

BENTO, C.A.M., CAVADA, B.S., OLIVEIRA, J.T.A., MOREIRA, R.A., BARJA-FIDALGO, C. Rat paw edema and leukocyte emigration induced by plant lectins. **Ag Actions**, v. 38, n. 1-2, p. 48-54, 1993.

BESSON, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1610–15, 1999.

BEUTH, J., KO, H.L., PULVERER, G., UHLENBRUCK, G. Importance of lectins for the prevention of bacterial infection and cancer metastases. **Glycoconjugate J**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 1995.

BEVILACQUA, M.P., NELSON, R.M., MANNORI, G. Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. **An Rev of Medicine**, v. 45, p. 361-378, 1994.

BERSTAD, J. Dextran-induced release of serotonin from isolated rat peritoneal mast cells. **Acta Pharmacol Toxicol**, v. 47, n. 3, p. 213-6, 1980.

BREWER, C.F.; MICELI, M.C.; BAUM, L.G. Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions. **Curr Opin Struct Biol**, v. 12, n. 5, p. 616-23, 2002.

BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E. Specific precipitating activity of plant agglutinins (lectins). **Science**, v. 119, n. 3091, p. 419, 1954.

BROID, D.H. **Inflammatory cells: Structure and Function**. In: STITES, D.D.; TERR, A.I. (Eds.), *Basic and Clinical Immunology*, Appleton and Lange, p. 141-83, 1991.

CALIXTO, J.B., BEIRITH, A, FERREIRA, J., SANTOS, A.R.S., CECHINEL- FILHO, V., YUNES, R.A. Naturally occurring antinociceptivesubstances from plants. **Phytother Res**, v. 14, n. 6, p. 401-18, 2000.

CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, R.A.; GRANGEIRO, T.B. Primary structures and funcions of plant lectins. **R Bras Fisiol Veg**, v. 5, p. 193-201, 1993.

CAVADA, B.S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T.B.; BARRAL-NETTO, M. Revisiting *proteus*: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Curr Protein Pept Sci**, v 2, n. 2, p. 1-13, 2001.

CAVADA, B.S.; IGLESIAS, M.M.; TRONCOSO, M.F.; TEIXEIRA, E.H.; TURYN, D.; DOMINICI, F.P. Glucose-mannose-binding lectins isolated from Brazilian beans stimulate the autophosphorylation of the insulin receptor in vitro. **Horm Metab Res**, v. 35, n. 2, p.125-27, 2003.

CHEN, Y.F.; TSAI, H.Y.; WU, T.S. Anti-inflammatory and analgesic activities from root of *Angelica pubescens*. **Planta Med**, v. 61, n. 1, p. 2–8, 1995.

COELHO, M.B.; DE SOUZA, I.A.; FREIRE, M.G.M.; MARANGONI, S.; ANTUNES, E.; MACEDO, M.L.R. Neutrophil migration in mice induced by a mannose-binding lectin isolated from *Annona coriacea* seeds. **Toxicon**, v. 48, n. 5, p. 529-35, 2006.

COELHO, R.R.; SOUZA, E.P.; SOARES, P.M.G.; MEIRELES, A.V.P.; SANTOS, G.C.M.; SCARPARO, H.C.; ASSREUY, A.M.S.; CRIDDLE, D.N. Effects of chloride channel blockers on hypotonicity-induced contractions of the rat trachea. **Br J Pharmacol**, v. 141, n. 2, p. 367–373, 2004.

COLLINS, T. Adhesion molecules in leukocyte emigration. **Sci Am Sci Med**, v. 2, n. 6, p. 28-37, 1995.

CORRÊA, C.R.; CALIXTO, J.B. Evidence for participation of B1 e B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **Br J Pharmacol**, v. 110, n. 1, p.193-198, 1993.

CRONSTEIN, B.N.; WEISSMAN, G. The adhesion molecules of inflammation. **Arthritis Rheum**, v. 36, n. 2, p.147-57, 1993.

CUNHA F.Q.; POOLE, S., LORENZETTI, B.B.; VEIGA, F.H.; FERREIRA, S.H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-4. **Br J Pharmacol**, v. 126, n.1, p. 45-50, 1999.

DAM, T.K.; CAVADA, B.S.; GRANGEIRO, T.B.; SANTOS, C.F.; DE SOUSA, F.A.; OSCARSON, S.; BREWER, C.F. Diocleinae lectins are a group of proteins with conserved binding sites for the core trimannoside of asparaginyl linked oligosaccharides and differential specificities for complex carbohydrates. **J Biol Chem**, v. 273, n. 20, p. 12082-88, 1998.

D'ARCY, W.C. *Canavalia*. Flora of Panamá. (Leguminosae). In: WOODSON, R.; SCHERY, R.W. **Eds Ann Miss Bot Gar**, v. 67, n. 3, p. 562-571, 1980.

DELATORRE, P., ROCHA, B.A., GADELHA, C.A., SANTI-GADELHA, T., CAJAZEIRAS, J.B., SOUZA, E.P., NASCIMENTO, K.S., FREIRE, V.N., SAMPAIO, A.H., AZEVEDO, W.F.Jr, CAVADA, B.S. Crystal structure of a lectin from *Canavalia marítima* (ConM0 in complex with trehalose and maltose reveals relevant mutation in ConA-like lectins. **J Struct Biol**, v. 154, n. 3, p. 280-6, 2006.

DI ROSA, M.; PAPADIMITRIOU, J.M.; WILLOUGHBY, D.A. A histopathological and pharmacological analysis of the mode of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **J Pathol**, v.105, n. 4,,p. 239-56, 1971.

EDELMAN, G.M.; WANG, J.L. Binding and functional properties of concanavalin A and its derivatives. III. Interactions with indoleacetic acid and other hydrophobic ligands. **J Biol Chem**, v. 253, n. 9, p. 3016-22, 1978.

ETZLER, M.E. In: The lectins: properties, functions and applications in Biology and Medicine, pp. 371-435. Liemer, I.E.; Sharon, N.; and Goldstein, I.J., Eds, **Academic Press**, 1986.

FEITOSA, R.F.; MELCIADES, G.B.; ASSREUY, A.M.; ROCHA, M.F.; RIBEIRO, R.A.; LIMA, A.A. The pharmacological profile of ovalbumin-induced paw oedema in rats. **Mediators Inflamm**, v. 11, n. 3 ,p.155-63, 2002.

FEIZI, T. Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are oco-developmental antigens. **Nature**, v. 314, n. 6006, p. 53-57, 1985.

FORTES, Z.B.; HYSLOP, S.; DENUCCI, G. Endothelial-derived vascular relaxing factors: role of nitric oxide. In: BRAIN, S.D. & PAGE, C. (Eds.), Immunopharmacology of the Microcirculation, **Academic Press**, New York, p.16-42, 1994.

FREIRE, M.G.M.; DESOUZA, I.A.; SILVA, A.C.M.; MACEDO, M.L.R.; LIMA, M.S.; TAMASHIRO, W.M.S.C.; ANTUNES, E.; MARANGONI, S. Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds. **Toxicon**, v. 42, n. 3, p. 275-280, 2003.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res Bull**, v. 48, n. 2, p.129-141, 1999.

GADELHA C.A., MORENO, F.B., SANTI-GADELHA, T., CAJAZEIRAS, J.B., ROCHA, B.A., ASSREUY, A.M., LIMA MOTA, M,R., PINTO, N.V., PASSOS MEIRELES, A.V., BORGES, J.C., FREITAS, B.T., CANDURI, F., SOUZA, E.P., DELATORRE, P.,

CRIDDLE, D.N., DE AZEVEDO, W.F. JR., CAVADA, B.S. Native crystal structure of a nitric oxide-releasing lectin from the seeds of *Canavalia maritima*. **J Struct Biol.** v.152, n. 3, p. 185-94, 2005.

Garcia-Leme, J. and Wilhelm, D.L. The effects of adrenalectomy and corticosterone on vascular permeability responses in the skin of the rat. **Br J Exp Pathol**, v. 56, p. 402-7, 1975.

GILMAN, E.F. *Canavalia maritima*. Fact sheet FPS-100, cooperative extension service. IFAS, University of Florida, Gainesville, 1999.

GODHWANI, S.; GODHWANI, J.L.; VYAS, O.S. *Ocimum sanctum*: Experimental study evaluating its anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity in animals. **J Ethnopharmacol**, v. 21, n. 2, p. 153-63, 1987.

GOLDSTEIN, A.M.; AMOS, C.I. Segregation analysis of breast cancer from the cancer and steroid hormone study: histologic subtypes. **J Natl Cancer Inst**, v.82, n. 24, p.1911-17, 1990.

GOLDSTEIN, I.J.; HUGHES, R.C.; MONSIGNY, M.; OZAWA, T.; SHARON, N. What should be called a lectin? **Nature**, v. 285, n. 66, p.60, 1980.

GOMES, J.C.; FERREIRA, R.R.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with concanavalin A. **Agents Actions**, v. 41, n. 3-4, p. 132-5, 1994.

GRUBB, B.D. Peripheral and central mechanism of pain. **Br J Anaesth**, v. 81, p. 8-11, 1998.

HAVT, A.; BARBOSA, P.S.; SOUSA, T.M.; MARTINS, A.M.; NOBRE, A.C.; NASCIMENTO, K.S.; TEIXEIRA, E.H.; PINTO, V.P.; SAMPAIO, A.H.; FONTELES, M.C.;

CAVADA, B.S.; MONTEIRO, H.S. Renal alterations promoted by the lectins from *Canavalia ensiformis* (ConA) and *Dioclea guianensis* (DguiL) seeds. **Protein Pept Lett**, v. 10, n. 2, p. 191-97, 2003.

HOSTANSKA, K.; VUONG, V.; ROCHA, S.; SOENGAS, M.S.; GLANZMANN, C.; SALLER, R.; BODIS, S.; PRUSCHY, M. Recombinant mistletoe lectin induces p53-independent apoptosis in tumour cells and cooperates with ionising radiation. **Br J Cancer**, v. 88, p.1785-92, 2003.

HUNSKAAR, S., FASMER, O.B., HOIE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **J Neurosci Methods**, v. 14, n. 1, p.69-76, 1985.

IALENTI, A.; IANARO, A.; MAFFIA, P.; SAUTEBIN, L.; DI ROSA, M. Nitric oxide inhibits leukocyte migration in carrageenan-induced rat pleurisy. **Inflamm Res**, v. 49, n. 8, p. 411–17, 2000.

KANKURI, E.; VAALI, K.; KORPELA, R.; PAAKKARI, I.; VAPAATALO, H.; MOILANEN, E. **Inflammation**, v. 25, n. 5, p. 301-10, 2001.

KANSAS, G.S. Selectins and their ligands: Current concepts and controversies. **Blood**, v. 88, n. 9, p. 3259-87, 1996.

KATZ, L.B.; THEOBALD, H.M.; BOOKSTAFF, R.C.; PETERSON, R.E. Characterization of the enhanced paw edema response to carrageen and dextran in 2,3,7,9-tetrachlordibenzo-p-dioxin-treated rats. **Pharmacol and Exp Ter**, v. 230, n.3, p. 670-677, 1984.

KLEHA, J.F.; DEVESLY, P.; JOHNS, A. The effects of lectins on the release of EDRF from rabbit aorta. **Br J Pharmacol**, v. 104, n.2, p. 287-288, 1991.

LAINE, R.A. A calculation of all possible oligosaccharide isomer, both branched and linear yields 1.05×10^{12} structures or a reducing hexasaccharide: the isomer barrier to

develop of single method saccharide sequencing or synthesis systems. **Glycobiology**, v. 4, n. 6, 1994.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacol Rev**, v. 53, n. 4, p.597-652, 2001.

LANDUCCI, E.C.T.; ANTUNES, E.; DONATO, J.L.; FARO, R.; HYSLOP, S.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; De NUCCI, G. Inhibition of carrageenin-induced rat paw edema by crotafotol, a polypeptide complexed with phospholipase A₂. **Br J Pharmacol**, v. 114, p. 578-583, 1995.

LANG, F.; BUSCH, G.L.; VOLKL, H.; Haussinger, D. Cell volume: a second message in regulation of cellular function. **New Physiol Sci**, v. 10, n. 80, p. 18-22, 1995.

LEVINE, J.; REICHLING, Y. Inflammatory pain. In R. D. Wall (Ed.), **Textbook of pain** p. 59-84, 1999.

LIMA, R.F.; CRIDDLE, D.N.; SOUZA, E.P.; SAMPAIO, A.H.; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S.; ASSREUY, A.M. Red marine alga *Bryothamnion triquetrum* lectin induces endothelium-dependent relaxation of the rat aorta via release of nitric oxide. **Pharm Pharmacol**, v. 56, n. 11, p. 1415-21, 2004.

LIS, H. SHARON, N. Lectins as molecules and tools. **Ann Rev Biochem**, v. 55, p. 35-67, 1986.

LO, T.N.; ALMEIDA, A.P.; BEAVEN, M.A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory responses in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 221, n. 1, p. 261-7,1982.

LOTAN, R.; RAZ, A. Endogenous lectins as mediators of tumor cell adhesion. **J Cell Biochem**, v. 37, p. 107-117, 1988.

MACIEL, E.V.; ARAUJO-FILHO, V.S.; NAKAZAWA, M.; GOMES, Y.M.; COELHO, L.C.; CORREIA, M.T. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals**, v. 32, p. 57-60, 2004.

MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E₂ using microdialysis inconscious rats. **Br J Pharmacol**, v. 114, n. 5, p. 1069-75, 1995.

MARONE, G.; GENOVESE, A.; GRANATA, F.; FORTE, V.; DETORAKI, A. de P.A, TRIGGIANI, M. Pharmacological modulation of human mast cells and basophils. **Clin Exp Allergy**, v. 32, n. 12, p. 1682-9, 2002.

MARTINS, A.M.; MONTEIRO, A.M.; HAVT, A., BARBOSA, P.S.; SOARES, T.F.; EVANGELISTA, J.S.; DE MENEZES, D.B.; FONTELES, M.C.; TEIXEIRA, E.H.; PINTO, V.P.; NASCIMENTO, K.S.; ALENCAR, N.M.; CAVADA, B.S.; MONTEIRO, H.S. Renal effects induced by the lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds. **J Pharm Pharmacol.**, v. 57, n. 10, p. 1329-33, 2005.

MATOS, A.B., ARTILES, G.R., VALDÉS, L.H., OLIVER, P.H. Revisión Taxonômica del Género *Canavalia* DC. (Leguminosae-Papilionoideae) em Cuba, **Rev Acad Colomb Cienc**, v. 28, n. 107, p. 157-75, 2004.

MAYHAN, W.G. Role of nitric oxide in modulating permeability of hamster cheeks pouch in response to adenosine 5-diphosphate and bradykinin. **Inflammation**, v 16, n. 4, p 295-305, 1992.

McEVER, R.P. Leukocyte interactions mediated by selectins. **Thromb Haemost**, v. 66, n. 1, p. 80-87, 1991.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**, v. 57, n. 1, p. 1-164, 1999.

MIRELMAN, D. ; GALUN, E.; SHARON, N. LOTAN, R. Inhibition of fungal growth by wheat germ agglutinin. **Nature**, v. 256, n. 5516, p. 414-6, 1975.

MONCADA, S. FERREIRA, S.H., VANE,J.R. pain and inflammation mediators. In: VANE,J.R., FERREIRA,S.H. **Inflammation**. Berlim: Springer Verlag heidelberg, p. 588-616, 1978.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, n. 2, p. 109-42, 1991.

MOODLEY, I.; MONGAN, J.L.; FOREMAN, J.C. Histamine release induced by dextran: the nature of the dextran receptor. **Eur J Pharmacol**. v. 83, n. 1-2, p. 69-81, 1982.

MOREIRA, R.A. & CAVADA, B.S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation and characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum**, v. 26, n. 2, p. 113-120, 1984.

MOREIRA, R.A.; AINOUIZ, I.L.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S. Plant lectins, chemical and biological aspects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 211-218, 1991.

MORRIS, M.R.; DEWITT, S.; LAFFAFIAN, I.; HALLETT, M.B. Phagocytosis by inflammatory phagocytes: experimental strategies for stimulation and quantification. **Methods Mol Biol.**, v. 225, p. 35-46, 2003.

MOTA, M.R.L.; CRIDDLE, D.N.; ALENCAR, N.M.N.; GOMES, R.C.; MEIRELES, A.V.P.; GADELHA, T.S.; GADELHA, C.A.; OLIVEIRA, C.C.; BENEVIDES, R.G.; CAVADA, B.S.; ASSREUY, A.M.S.; Modulation of acute inflammation by a chitin-binding lectin from *Araucaria angustifolia* seeds via mast cells. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 374, n. 1, p. 1-10, 2006.

NAPIMOGA, M..H, CAVADA, B.S., ALENCAR, N.M., MOTA, M.L., BITTENCOURT, F.S., ALVES-FILHO, J.C., GRESPAN, R., GONÇALVES, R.B., CLEMENTE-NAPIMOGA, J.T., PARADA, C.A., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q. Lonchocarpus sericeus lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokine and chemokines production. **Int Immunopharmacol**, v.7, n. 6, p. 824-35, 2007.

NATHAN, C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? **J Clin Invest**, v. 100, n. 10, p.2417-23, 1997.

NORTHOVER, A.M.; NORTHOVER, B.J. Lectin-induced increase in microvascular permeability to colloidal carbon in vitro may involve protein kinase C activation. **Ag Actions**, v. 41, n. 3-4, p. 136-39, 1994.

OMOTE, K.; KAWAMATA, M.; NAMIKI, A. Formalin-induced release of excitatory amino acids in the skin of the rat hindpaw. **Brain Research**, v. 787, n. 1, p. 161-164, 1998.

PALMER, R.M.J.; FERRIGE, A.G. & MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, n. 6122, p. 524-526, 1987.

PANÉS, J.; PERRY, M.; GRANGER, D.N. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. **Br J Pharmacol**, v. 126, n. 3, p. 537-50, 1999.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.**, v. 109, n. 2, p. 347-52, 1995.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Rev in Plant Science**, v. 17, n. 6, p. 575-692, 1998.

RADEMACHER, T.W.; PAREKH, R.B.; DWEK, R.A.; ISENBERG, D.; ROOK, G.; AXFORD, J.S.; ROITT, I. The role of IgG glycoforms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Springer Semin Immunopathol**, v. 10, n. 2-3, p. 231-49, 1988.

ROBBINS, S.S., COTRAN, R.S., KUMAR, V. Pathologic basis of diseases. **Philadelphia: saunders** W.B., 1994. Cap 3: inflammation and repair.

ROCHA E SILVA, M.O. A brief history of inflammation. In: VANE, J.R. & FERREIRA, S.H. **Handbook Exp Pharmacol**, Springer-Verlag. v. 50, n.1, p. 6-25, 1978.

RODRIGUEZ, D.; CAVADA, B.S.; OLIVEIRA, J.T.A.; MOREIRA, R.A.; RUSSO, M. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. **Braz J Med Biol Res**, v. 25, n. 8, p. 823-6, 1992.

ROSLAND, J.H.; TJOLSEN, A.; MAEHLE, B.; HOLE, K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**, v. 42, n. 2, p. 235-42, 1990.

SALVEMIMNI, D.; WANG, Z.; ZWEIER, J.L.; SAMOUILOV, A.; MACARTHUR, H.; MISKO, T.P.; CURRIE, M.G.; CUZZOCREA, S.; SIKORSKI, J.A.; RILEY, D.P. A nonpeptidyl mimic of superoxide dismutase with therapeutic activity in rats. **Sciense**. v. 186, n. 5438, p. 304-6, 1999.

SANTI-GADELHA, T.; GADELHA, C.A.; ARAGÃO, K.S.; OLIVEIRA, C.C.; MOTA, M.R.L.; GOMES, R.C.; DE FREITAS, P.A.; TOYAMA, M.H.; DE OLIVEIRA, T.D.; ALENCAR, N.M.N.; CRIDDLE, D.N.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S.; Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seeds lectin. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 350, n. 4, p. 1050-55, 2006.

SANTOS, A.R.S.; NIERRO, R., CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R.A.; PIZZOLATTI, M.G.; DELLE MONACHE, F.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties of steroids isolated from *phyllanthus corcovadensis*. **Planta Med**, v. 61, n. 4, p. 329-31, 1995.

SANZ-APARÍCIO, J.; HERMOSO, J.; GRANJEIRO, T.B.; CALVETE, J.J.; CAVADA, B.S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct lectin biological properties from Concanavalin A. **FEBS Letters**, v. 405, n. 1, p. 114-8, 1997.

SCHAAF-LAFONTAINE, N.; HOOGHE, R. J.; PLAETSE, F.V. Modification of blood-borne arrest properties of lymphoma cells by inhibitors of protein glycosylation suggests the existence of endogenous lectins. **Carbohydr Res**, v. 138, n. 2, p. 315-23, 1985.

SIMON, S.I.; GREEN, C.E. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 7, p. 151–185, 2005.

SINGH, R.S.; TIWARY, K.; KENNEDY, J. F. Lectins: sources, activities and applications. **Crit Rev in Biotech**, v. 19, n. 2, p. 145-178, 1999.

SEDGWICK, D.; WILLOUGHBY, D.A. Initiation of inflammatory response and its prevention. In: BONTA, I.L., BRAY, M.A. & PARNHAM, M.J. **Handbook of Inflama.**, Elsevier. v. 5, p. 25-47, 1985.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins – a large family of homologous proteins. **FASEB J**, v. 14, n. 4, p. 3198-208, 1990.

SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in Cell Recognition. **Scientific American**, v. 268, n.1, p.82-89, 1993.

SHARON, N.; LIS, H. Glycoproteins: structure and function. In: GABIUS, H-J.; GABIUS, S. (Eds.) **Glycosciences: status and perspectives**. Weinheim: Chapman & Hall, p. 133-162, 1997.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v.14, n. 11, p.53R-62R. 2004.

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v.38, n. 3, p. 447-352, 1989.

SHLYAKHOVENKO, V.A.; KOZAK, V.V.; VINARCHUK, M.P. Expression of lectin receptors in sites Ehrlich tumor cells under modified polyamine levels. **Exp Oncol**, v. 17, p. 119-123, 1995.

SLIFKIN, M. DOYLE, R. J. Lectins and their applications to clinical microbiology. **Clin Microbiol Rev**, v. 3, p. 197-218, 1990.

STILMARK, H. Ricin, a toxic enzyme from seeds of *Ricinus communis*.L. and some other Eupobiaceae. Dissertation, Medical School of Dorpart, Estonia, 1988.

SOUZA, G.E.P.; CUNHA, F.Q.; MELLO, R.; FERREIRA, S.H. Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents Actions**, v. 24, n. 3-4, p. 377-380, 1988.

TEIXEIRA, M.J., CORREA, C.F.; PIMENTA, C.A.M. **Dor: Conceitos Gerais**. São Paulo: Limay, 1994. p. 72.

THIEMERMANN, C. Nitric oxide and septic shock. *Gen Pharmacol*, v 29, n. 1, p. 159-166, 1997.

THOMAZZI, S.M.; RIBEIRO, R.A.; CAMPOS, D.I.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Tumour necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-8 mediate the nociceptive activity of the supernatant of LPS-stimulated macrophages. **Mediators Inflamm**, v. 6, n. 3, p 195-200, 1997.

TJØLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of method. **Pain**, v. 51, n. 1, p. 5-17, 1992.

TJØLSEN, A. & HOLE, K. Animal models of analgesia. In: The pharmacology of pain., BESSON, M. J.; DECKESON, A. Berlin: **Springer-Verlag**, p. 21-41, 1997.

ZHANG, L.; HSU, C.H.; ROBINSON, C.P. Effects of ricin administration to rabbits on the ability of their coronary arteries to contract and relax in vitro. **Toxicol App Pharmacol**, v. 129, n. 1, p. 16-22, 1994.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)