UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ

SABRINA RODRIGUES FONTENELE

EFEITO VASODILATADOR DAS LECTINAS DE DIOCLEINAE *CANAVALIA GLADIATA* E *CANAVALIA BRASILIENSES*

Fortaleza – Ceará

2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ

SABRINA RODRIGUES FONTENELE

EFEITO VASODILATADOR DAS LECTINAS DE DIOCLEINAE *CANAVALIA GLADIATA* E *CANAVALIA BRASILIENSES*

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

Fontenele, Sabrina Rodrigues

EFEITO VASODILATADOR DAS LECTINAS DE Diocleinae *Canavalia gladiata* e *Canavalia brasiliensis.* / Sabrina Rodrigues Fontenele. - Fortaleza, 2009

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. Fisiologia. 2. Lectina. 3. Canavalia gladiata. 4. Canavalia brasiliensis. I. Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde.

Universidade Estadual do Ceará

Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas

Título do Trabalho: EFEITO VASODILATADOR DAS LECTINAS DE Diocleinae *Canavalia gladiata* e *Canavalia brasiliensis*

Autora: Sabrina Rodrigues Fontenele

Banca examinadora

_____

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

_____

Profa. Dra. Vânia Marilande Ceccatto
Universidade Estadual do Ceará - UECE

_____

Prof. Dr. Mário Rogério Lima Mota
Universidade Federal do Ceará - UFC

A Deus, aos meus pais, ao meu avô e a memória de minha avó Joaquina Scipião Rodrigues

Dedico este Trabalho

AGRADECIMENTOS

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

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.

Ao Prof. Dr. Benildo de Souza Cavada pelo fornecimento das lecitinas para a realização desse trabalho.

Aos Profs. Dra. Vânia Marilande Ceccatto e Dr. Mário Rogério Lima Mota pela participação em minha banca.

A Raphaela, pela importante contribuição na realização dos experimentos e pela convivência agradável e amiga.

Gostaria de agradecer de forma muito especial a Alana e Natália pelo companheirismo na realização dos experimentos, pela ajuda nessa dissertação, pois sem elas não seria possível, e por me permitir o privilégio de sua convivência e amizade sincera.

A todos os colegas que fazem parte do LAFFIN pela cumplicidade do dia a dia de um laboratório de pesquisa.

Ás amigas Juliana Zani e Ana Paula Rodrigues, pela amizade e pelos momentos de noites mal dormidas, estudando para seleção do mestrado.

Aos amigos Rommulo, Débora e Clauber, pelo apoio, incentivo e momentos de descontração.

Aos meus pais que apesar das dificuldades fizeram da minha educação uma prioridade.

Á minha irmã Lise, meu avô Nilson e demais familiares, por serem símbolo de união e companheirismo em todos os momentos de minha vida.

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

A todos a minha mais sincera gratidão.

RESUMO

EFEITO VASODILATADOR DAS LECTINAS DE Diocleinae *Canavalia gladiata* e *Canavalia brasiliensis* – **SABRINA RODRIGUES FONTENELE**. Dissertação apresentada ao Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas, UECE, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

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. Lectinas da subtribo Diocleinae apresentam alta similaridade estrutural. O papel da lectina de *C. brasiliensis* (ConBr) na inflamação já tem sido bastante explorado, mas pouco se sabe sobre outras lectinas pertencentes ao mesmo gênero. Neste trabalho, foram investigados efeitos vasculares *in vivo* e *in vitro* das lectinas de Diocleinae *C. brasilienses* e *C. gladiata* (CgL) em modelos de edema de pata e contratilidade do músculo liso vascular utilizando ratos Wistar (150-250g). Para investigação da atividade pró-edematogênica, as lectinas foram injetadas (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 pelas lectinas de ConBr e CgL, os animais receberam as lectinas (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 das lectinas, os animais foram tratados ½ ou 1h antes da lectina (1mg/kg; s.c.) com: L-NAME (30mg/kg; e.v.), indometacina (5 mg/kg; s.c.), ácido niflúmico (30mg/kg; i.p.). Resultados expressos como Média ± E.P.M. e analisados por ANOVA ($p<0,05$ fixado para indicar significância estatística). *In vivo*, as lectinas induziram edema de pata com extravasamento de proteína. O edema da CgL e da ConBr, significante 32h após o estímulo, envolve a participação de prostaglandinas, canais de cloreto e óxido nítrico (NO). A associação das lectinas com seus açúcares ligantes revertem parcialmente seus efeitos. *In vitro*, a CgL promoveu relaxamento em aorta com participação de NO, prostaciclina e fator hiperpolarizante derivado do endotélio, enquanto no efeito da ConBr participam somente prostaciclinas e NO. A participação da prostaciclinas e fator hiperpolarizante derivado de endotélio em respostas relaxantes de lectinas é inédita. Embora lectinas de *Canavalia* apresentem similaridade estrutural, nós distinguimos diferenças na potência e nos mecanismos da resposta inflamatória e relaxante, que poderia ser atribuída a alterações discretas na estrutura primária das lectinas.

Palavras-chave: Lectina, *Canavalia*, inflamação, contratilidade, efeitos vasculares.

ABSTRACT

VASODILATOR EFFECTS OF DIOCLEINAE LECTINS *Canavalia gladiata* and *Canavalia brasiliensis* – **SABRINA RODRIGUES FONTENELE**. Dissertation submitted to the Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas-UECE, as partial requirement to achieve the degree of Master in Physiology

Lectins from the Diocleinae subtribe exhibit high structural similarity. The role of C. brasiliensis lectin (ConBr) in the inflammation have being exploited, but little is known about other lectins belonging to the same genus, such as C. gladiata (CgL). Here, vascular activities of ConBr and CgL were investigated *in vivo* and *in vitro* in models of paw edema and contractility of smooth muscle using aorta of Wistar rats. *In vivo*, the lectins induced paw edema with protein leakage. The edema elicited by CgL and ConBr, the most inflammatory one, lasted 32h, involving prostaglandins, chloride channels and nitric oxide (NO). The lectins association with their specific sugar prevent their effects with different potentials for each lectin, differentiated prevented its effects. In vitro, CgL elicited aorta relaxation with NO, prostacyclin and EDHF participation, while the ConBr effect, only prostaglandins and NO participated. Participation of prostacyclin and EDHF in lectin relaxant responses is inedited. Although the structural similarity of Canavalia lectins, we distinguished different degrees and mechanisms in inflammatory and relaxant responses, which could be attributed to discrete alterations in the lectins primary structures.

Keywords: *Canavalia* lectins, inflammation, contractily, vascular effects.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Tipos de lectinas, de acordo com seus sítios de atividade biológica	15
Figura 2	Leguminosa *Canavalia brasiliensis* MART	20
Figura 3	Leguminosa *Canavalia gladiata*	21
Figura 4	Estrutura primária das lectinas de *Canavalia gladiata* e *Canavalia brasiliensis*	23
Figura 5	As lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* induzem edema de pata	41
Figura 6	As lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* induzem aumento de permeabilidade vascular em pata de ratos	42
Figura 7	A atividade edematogênica das lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* é inibida pela ocupação do sítio lectínico com glicose	44
Figura 8	Indometacina inibe o edema de pata induzido pelas lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis*	46
Figura 9	inibe o edema de pata induzido pelas lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis*	47
Figura 10	L-NAME inibe de forma diferenciada o edema de pata induzido pelas lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis*	48
Figura 11	Efeito relaxante das lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* em aortas endotelizadas contraídas por fenilefrina	51
Figura 12	Ausência de efeito relaxante das lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* em anéis de aorta sem endotélio contraídas por fenilefrina	52
Figura 13	As lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* não alteram o tônus basal de aortas endotelizadas	54
Figura 14	O relaxamento induzido pelas lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* em aortas endotelizadas contraídas por fenilefrina envolve o reconhecimento do domínio lectínico	55
Figura 15	Indometacina reverte parcialmente o efeito relaxante das lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* em aortas endotelizadas	58
Figura 16	Tetraetilamônio reverte parcialmente o efeito relaxante das lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* em aortas endotelizadas	60
Figura 17	L-NAME reverte os efeitos relaxantes das lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* em aortas endotelizadas contraídas por fenilefrina	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Avaliação do curso temporal do edema induzido pelas lectinas de *Canavalia gladiata* e *Canavalia brasiliensis* com diferentes bloqueadores farmacológicos 50

Tabela 2 Avaliação do efeito relaxante das lectinas de *Canavalia gladiata* e *Canavalia brasiliensis* com diferentes bloqueadores farmacológicos 64

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
$[Ca^{+2}]_i$	Concentração de cálcio intracelular
ACh	Acetilcolina
ADP	Adenosina Dinucleotídeo Fosfato
ANOVA	Análise de Variância
ASC	Área sob a Curva
AST	Aspartato Amino Transferase (enzima)
C3a	Terceiro componente do sistema complemento ativado
C5a	Quinto componente do sistema complemento ativado
CGL	Lectinas de sementes de *Canavalia gladiata*
ConA	Concanavalina; lectina de *Canavalia ensiformis*
ConBr	Lectinas de sementes de *Canavalia brasilienses*
COX - 1	Ciclooxigenase - 1
COX - 2	Ciclooxigenase - 2
DAG	Diacilglicerol
e.v.	Endovenosa
EDRFs	Fatores relaxantes derivado do endotélio
eNOS	Isoforma endotelial da enzima óxido nítrico sintase (Endothelial form of nitric oxide synthase)
EPM	Erro padrão da média
i.p.	Intraperitoneal
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
INDO	Indometacina
iNOS	Isoforma induzida da enzima óxido nítrico sintase (Inducible form of nitric oxide synthase)
IP_3	Trifosfato de inositol
KCl	Cloreto de potássio

L-NAME	N^G- nitro-L-arginina-metil-éster
MCLK	Miosina quinase de cadeia leve
MCLP	Miosina fosfatase de cadeia leve
MEK	Quinase ativada por MAPK
NFA	Ácido Niflúmico
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOSi	Isoforma induzível da NOS
PAF	Fator de ativação de plaquetas (Platelet Activator Factor)
PCAM-1	Molécula de adesão de célula endotelial e plaqueta
PG	Prostaglandinas
PGE_2	Prostaglandina E_2
PGI	Prostaciclina
Phe	Fenilefrina
PKC	proteína quinase C
RIPs	Proteínas inativadoras de ribossomos (Ribosome Inactivating Proteins)
s.c.	Subcutânea
TEA	Ácido tetraetilamônio
TN	tyrode
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

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14

1.1. Lectinas 14

1.2. Lectinas de plantas superiores 17

1.3. Efeitos biológicos de lectinas de leguminosas 18

1.4. *Canavalia gladiata* e *Canavalia brasiliensis* 20

1.5. Lectinas das sementes de *Canavalia gladiata* e *Canavalia brasiliensis* 21

1.6. Resposta inflamatória 23

1.6.1 Eventos vasculares da resposta inflamatória 24

1.6.2 Mediadores inflamatórios 25

1.7. Contratilidade 28

2. JUSTIFICATIVAS 31

3. OBJETIVOS 32

4. MATERIAIS E MÉTODOS 34

4.1. Animais 34

4.2. Lectinas utilizadas 34

4.3. Drogas e reagentes 34

4.4. Caracterização das atividades biológicas das lectinas de *Canavalia brasilienses* e *Canavalia gladiata* em modelos experimentais de inflamação 35

4.4.1. Descrição do Modelo de Edema de Pata em ratos 35

4.4.2. Investigação da participação de resíduos de carboidratos nas ações das lectinas na inflamação 37

4.4.3 Modelo de contratilidade: anéis isolados de aorta 37

4.5. Análise estatística 39

5. RESULTADOS 40

5.1. Efeito edematogênico das lectinas de *Canavalia gladiata* e *Canavalia brasiliensis* 40

5.2. As lectinas de *Canavalia gladiata* e *Canavalia brasiliensis* induzem aumento de permeabilidade vascular 40

5.3. Participação do domínio lectínico no efeito edematogênico das lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* 43

5.4. Participação de mediadores inflamatórios no efeito edematogênico das lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* 45

5.5 As lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* relaxam aortas endotelizadas pré-contraídas com fenilefrina 50

5.6 As lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* não alteram o tônus basal de aortas endotelizadas 53

5.7 O relaxamento induzido pelas lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* em aortas endotelizadas contraídas por fenilefrina envolve o reconhecimento do domínio lectínico 53

5.8 Envolvimento de prostaciclina no efeito relaxante das lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* sobre aortas endotelizadas contraídas por fenilefrina 57

5.9 Tetraetilamônio reverte parcialmente o efeito relaxante da lectina de *C. gladiata*, mas não de *C. brasiliensis* em aortas endotelizadas contraídas com fenilefrina 59

5.10 L-NAME reverte o efeito das lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* em aortas endotelizadas contraídas por fenilefrina 61

6. DISCUSSÃO 64

7. CONCLUSÕES 69

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 70

1 INTRODUÇÃO

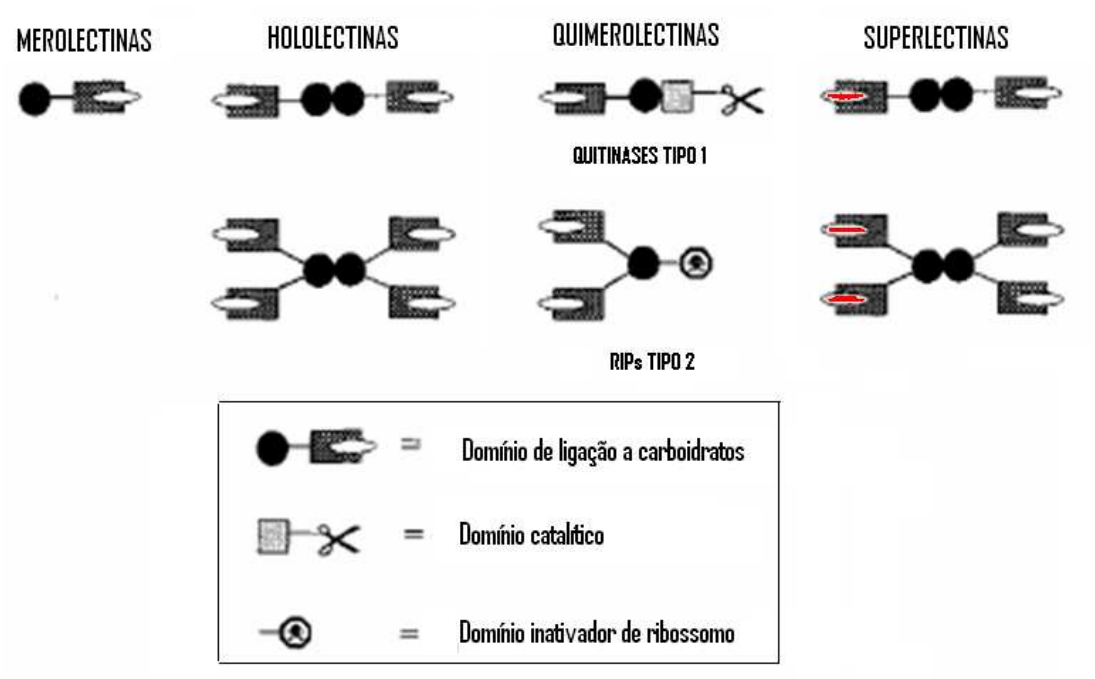
1.1 Lectinas

Lectinas são proteínas amplamente distribuídas nos seis grandes grupos da classificação geral dos seres vivos: Archeobacteria, Eubactéria, Protista, Plantae, Fungi, e Animalia, assim como nos vírus (SHARON e LIS, 1997). Foram inicialmente definidas como proteínas aglutinadoras de células com especificidade de reconhecimento por carboidratos (SHARON e LIS, 1972). Mais tarde, esse conceito foi ampliado por Goldstein e cols. (1980), definindo lectinas como proteínas/glicoproteínas de origem não imune com especificidade de ligação a carboidratos, e capazes de aglutinar células e/ ou precipitar glicoconjugados. Em 1995, Beuth e cols atualizaram esta definição para “lectinas são proteínas que apresentam pelo menos um sítio de ligação não catalítico, o qual se liga de forma reversível e específica a mono ou oligossacarídeos, sendo este domínio denominado domínio lectínico”. Em geral as lectinas são oligoméricas e suas ligações a carboidratos são fracas, do tipo pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e forças de Van der Walls (SHARON e LIS, 1995).

Peumans e Van Damme (1995) classificaram as lectinas de acordo com seus sítios de atividade biológica em três grupos: Merolectinas, Hololectinas e Quimerolectinas (Fig. 1).

As merolectinas são biomoléculas que apresentam apenas um domínio lectínico, sendo assim incapazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Como representantes dessa classe têm-se as lectinas de orquídea, específicas para manose e as lectinas de haveína, uma proteína do látex da seringueira (VAN PARIJS et al., 1991).

As hololectinas são proteínas que apresentam mais de um sítio de ligação para carboidratos, sendo capazes de aglutinar células ou precipitar conjugados, tendo como representante a maioria das lectinas vegetais.



Fonte: *Adaptado de Peumans e Van Damme, 1995, 1998.*

Figura 1 - Tipos de lectinas, de acordo com seus sítios de atividade biológica

As quimerolectinas são lectinas que possuem um ou mais sítios de ligação a carboidratos, além de possuir outro sítio não lectínico com atividade biológica. Como exemplos dessa classe citam-se as proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2 (RIPs). Posteriormente, Peumans e Van Damme em 1998, adicionaram a essa classificação as Superlectinas, que se referem à proteínas que apresentam dois ou mais sítios lectínicos, porém com especificidades a carboidratos diferentes. É o caso da jacalina (lectina de sementes *Artocarpus integrifolia* - MOREIRA e AINOUZ, 1978) e da frutalina (lectina de sementes de *Artocarpus incisa* - MOREIRA *et al*., 1998), que se ligam tanto a D-galactose como a D-manose.

Nos últimos anos, têm-se mostrado uma variedade de efeitos biológicos de lectinas e seu envolvimento em processos de infecção por vírus, bactérias e protozoários às células do hospedeiro (SHARON e LIS, 2001). Nos animais e microorganismos, elas podem servir para mediar diversos eventos relacionados ao controle da biossíntese de glicoproteínas, à comunicação celular, à regulação do crescimento, da apoptose e do ciclo celular, à marcação de alvos para enzimas lisossomais, à defesa, à metástase tumoral, à inflamação, à reprodução, etc.

(CAVADA *et al.*, 2001; revisado por SHARON e LIS, 2004). Além disso, foi comprovada a participação dessas moléculas na adesão de leucócitos ao endotélio vascular, evento importante na migração celular e conseqüentemente no recrutamento de células que vão promover a resposta de defesa do organismo contra agentes agressores (revisado por SHARON e LIS, 2001).

A propriedade mais amplamente conhecida de lectinas é a capacidade de aglutinar eritrócitos de diferentes espécies. Além de eritrócitos, outras células como leucócitos, fibroblastos e células tumorais também podem ser aglutinadas por estas proteínas (BEUTH *et al*., 1995; GOLDSTEIN e AMOS, 1990).

O melhor entendimento acerca dessas proteínas também 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 e favorecem metástases (SHLYAKHOVENKO *et al*., 1995). Mostrou-se ainda que a circulação de células cancerígenas no sangue pode formar êmbolos devido a ações lectínicas (LOTAN e RAZ, 1988). Alguns autores têm demonstrado atividade anti-tumoral (ANDRADE *et al*., 2004) e indução de apoptose em células tumorais por lectinas vegetais (HOSTANSKA *et al*., 2003). Baseado nessas informações foi demonstrado a perda da habilidade de colonização de certas células tumorais a seus respectivos tecidos alvos, através de modificações de oligossacarídeos dos gliconjugados existentes nas superfícies das células estudadas (SCHAAF-LAFONTAINE *et al*., 1985). Destacam-se ainda a vantagem da associação de fármacos quimioterápicos a lectinas ligantes de gliconjugados presentes na superfície de células tumorais, o que possibilita a diminuição da dose terapêutica dos quimioterápicos (GOLDSTEIN *et al*., 1980).

A descoberta da patogênese de algumas doenças infectocontagiosas como a pneumonia, abriu horizontes para o desenvolvimento de terapêuticas alternativas, baseadas no conhecimento da interação lectínica. A exemplo disso, Beuth e cols. (1995) inibiram a adesão de *Streptococcus pneumoniae* em pulmão de camundongos pela administração traqueal de N-acetilglicosamina.

Têm sido demonstrados efeitos importantes sobre a contratilidade do músculo liso. As lectinas da alga vermelha *Bryothamnion triquetrum* (LIMA *et al*.,

2004) e da leguminosa *Canavalia maritma* (GADELHA *et al*., 2005) relaxam anéis de aorta endotelizada via aumento da atividade da enzima óxido óxido nítrico sintase endotelial, responsável pela síntese de óxido nítrico; O tratamento de coelhos com ricina (lectina extraída da planta *Ricinus communis,* conhecida vulgarmente como mamona) potencializa a contração induzida por serotonina e histamina em artérias coronárias (ZHANG *et al*., 1994). Também foi demonstrado que a concanavalina A (ConA) e a lectina do germe do trigo (WGA) produzem relaxamento dependente de endotélio em aorta de coelho (KLEHA *et al.*, 1991).

No processo inflamatório, foi descrito que a lectina animal PSP-I/PSP-II, uma espermadesina presente no plasma seminal de suínos apresentava efeito pró-inflamatório, induzindo edema de pata e migração de neutrófilos em modelos *in vivo* e *in vitro*. A atividade quimiotática induzida por esta lectina ocorre via liberação de TNF-α (ASSREUY *et al*., 2002; 2003). Nestes modelos, também foram descritos efeitos pró- e antiinflamatórios para a lectina da Gymnosperma *Araucaria angustifolia* por interferência com os mecanismos de liberação de histamina (MOTA *et al.,* 2006; SANTI-GADELHA *et al.,* 2007). As microalgas marinhas *Chlorella stigmatophora*, *Phaeodactylum tricornutum* (GUZMAN *et al*., 2001) e *Amansia multifida* (NEVES *et al*., 2007), por outro lado, mostraram significantes efeitos antiinflamatórios.

Muitas destas atividades biológicas estão relacionadas à interação da lectina com açúcares presentes nas superfícies celulares. A comprovação da participação do domínio lectínico nos diferentes processos de reconhecimento celular é possível pela inibição do efeito da lectina através da ligação da mesma ao seu açúcar/glicoconjugado específico, por modificação química dos carboidratos de superfície celulares, ou pelo uso de células mutantes (YUEN *et al.,* 1994). Entretanto, lectinas podem apresentar outros sítios ligantes específicos para moléculas de natureza não glicídica.

1.2 Lectinas de plantas superiores

O papel fisiológico de lectinas de origem vegetal é muito discutido entre os pesquisadores. Essas biomoléculas parecem estar envolvidas com a defesa do

vegetal contra insetos e fungos, com a regulação de fitohormônios que controlam o crescimento e o desenvolvimento da planta e com a associação do vegetal a simbiontes (SANZ-APARICIO *et al*., 1997).

Van Damme e cols., 1998 dividiram as lectinas vegetais em sete diferentes famílias: lectinas de leguminosas; lectinas de monocotiledôneas ligadoras de manose; lectinas ligadoras de quitina; lectinas RIPs tipo 2; lectinas semelhantes a jacalina; lectinas semelhantes a amarantina e lectinas de floema de cucurbitácea.

No reino vegetal os grupos mais estudados são as lectinas de plantas superiores pertencentes à divisão Angiospermae (SHARON e LIS, 1990), principalmente aquelas de sementes de leguminosas. Estas plantas merecem destaque principal, devido à elevada concentração protéica de lectinas em suas sementes maduras (mais de 10%) e a facilidade de obtenção das mesmas.

As lectinas de leguminosas, normalmente são constituídas de duas ou quatro subunidades de 25 a 30KDa, e a interação entre a proteína e o carboidrato se torna estável na presença de íons Ca^{++} e Mn^{++} ligados a lectina. Além disso, essas lectinas embora com diferentes afinidades de reconhecimento a carboidratos, possuem propriedades bioquímicas e físico-químicas semelhantes, apresentando um grau de homologia considerável entre as suas seqüências de aminoácidos. Apesar das semelhanças estruturais, estas proteínas elicitam diferentes atividades biológicas, ou ainda para uma dada atividade, diferentes perfis de resposta (CAVADA *et al.,* 1993; 2001).

1.3 Efeitos de lectinas de leguminosas na inflamação

No tocante à resposta inflamatória e imune, têm-se evidenciado o papel destas lectinas em eventos vasculares e celulares, tanto em experimentos *in vivo* quanto *in vitro*. Demonstrou-se indução da proliferação de linfócitos e produção de interferon-γ (BARRAL-NETO *et al*., 1992); ativação de macrófagos e liberação de peróxido de hidrogênio (RODRIGUEZ *et al*., 1992); formação de edema de pata (BENTO *et al*., 1993); estimulação da migração de neutrófilos para cavidade peritoneal (BENTO *et al*., 1993; COELHO *et al*., 2006); indução da liberação de

histamina por mastócitos (GOMES *et al*., 1994); proteção parcial *in vivo* em animais infectados com *Leishmania amazonensis* (BARRAL-NETO *et al.,* 1996); produção de óxido nítrico (ANDRADE *et al*., 1999) e indução de apoptose (BARBOSA *et al*., 2001).

Nota-se que a maioria dos efeitos descritos na literatura sobre lectinas vegetais na inflamação se refere as suas ações pró-inflamatórias. No entanto, nosso grupo vem demonstrando que, estas lectinas podem produzir respostas anti- ou pró-inflamatórias, dependendo da via de administração utilizada. Quando administradas sistemicamente, provocam respostas inibitórias: lectinas ligadoras de glicose-manose inibiram a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal e o edema de pata em ratos, bem como a cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida em camundongos (ASSREUY *et al*., 1997; 1999; ALENCAR *et al*., 1999); a lectina ligadora de N-acetil-glicosamina, isolada de *Lonchocarpus sericeus,* inibiu a peritonite infecciosa em ratos (ALENCAR *et al.*, 2005) e a peritonite não infecciosa induzida por ovoalbumina em camundongos via inibição da produção de citocinas e quimiocinas, bem como pela diminuição do rolamento e adesão dos leucócitos ao endotélio vascular (NAPIMOGA *et al*., 2007). Por outro lado, quando administradas localmente, provocam respostas estimulatórias: a lectina de *Vatairea macrocarpa in vivo* induziu migração de neutrófilos para cavidade peritoneal e edema de pata em ratos (ALENCAR *et al*., 2003; 2004) e *in vitro* induziu quimiotaxia de neutrófilos via liberação de substâncias quimiotáticas por macrófagos (ALENCAR *et al*., 2007) e que a lectina de Pisum arvense estimula a quimiotaxia de neutrófilos *in vivo* e *in vitro* (ALENCAR ET AL., 2005a).

Efeitos vasculares também foram descritos em microvasculatura *in vitro* para uma lectina ligadora de N-acetil-D-glicosamina, cuja resposta estimulante sobre a permeabilidade foi revertida por seu açúcar ligante (NORTHOVER e NORTHOVER, 1994). Sobre o músculo liso vascular, foram observadas respostas opostas. *In vivo*, a lectina do *Ricinus communis* potencializou as respostas contracturantes elicitadas por serotonina e histamina (ZHANG *et al.,* 1994), enquanto que *in vitro*, respostas relaxantes foram observadas para a ConA e lectina do germe de trigo (WGA) em coelhos (KLEHA *et al.,* 1991) e para a leguminosa *Canavalia maritma* em aortas de ratos (GADELHA *et al*., 2005).

1.4 *Canavalia gladiata* e *Canavalia brasiliensis*

A *Canavalia gladiata* (Fig. 2) também é uma planta pertencente à família Leguminosae, Tribo Phaseoleae e Subtribo Diocleinae (DAM *et al.,* 1998). Esta planta é conhecida popularmente como feijão espada, sendo uma fonte de proteínas e calorias para a população de áreas pobres do Nordeste brasileiro. Possui cerca de 35% de proteínas e um baixo teor de aminoácidos sulfurados. Apresenta características agronômicas favoráveis para o cultivo nos trópicos, sendo considerada de alta durabilidade entre as leguminosas. Fatores anti-nutricionais como ácidos fenólicos, taninos, saponinas, inibidores da alfa-amilase e lectinas também estão presentes no feijão espada (MORENO *et al*., 2004).

Figura 2 - Leguminosa *Canavalia gladiata*

A *Canavalia brasiliensis* MART. (Fig. 3) é uma planta angiosperma, conhecida popularmente como feijão bravo do Ceará. Pertence à família Leguminosae, Tribo Diocleae e subtribo Diocleinae (DAM *et al*., 1998). Trata-se de uma planta nativa do continente americano, onde se encontra amplamente distribuída. No Brasil, é encontrada nas regiões Sudeste e Nordeste, adaptando-se muito bem a solos de baixa fertilidade (CRUZ *et al.*, 1995). Devido ao seu sistema

de raiz amplo e profundo, a espécie pode contribuir à melhora da estrutura do solo, à estabilização de locais propícios à erosão e à ciclagem de nutrientes, sendo, assim, muito utilizada como adubo, no controle da desertificação e da erosão (CARVALHO & SODRE FILHO, 2000; COBO *et al.*, 2002). Em regiões pobres do Nordeste brasileiro, a semente é utilizada como nutriente em épocas de baixa disponibilidade de alimento.

Figura 3 - Leguminosa *Canavalia brasiliensis* MART

1.5 Lectinas das sementes de *Canavalia gladiata* e *Canavalia brasiliensis*

A lectina de *Canavalia gladiata* é uma hololectina composta de duas subunidades idênticas de 30-kDa e mostrou 95% de identidade relacionada a seqüência de aminoácidos quando comparada com a ConA. Foi purificada e descrita por Moreno e cols. (2004), e apresenta especificidade por resíduos de α-D-manose e α-D-glicose, bem como por oligossacarídeos e polissacarídeos que contenham esses monossacarídeos. Pouco se sabe sobre os efeitos biológicos da lectina de *C. gladiata*. No entanto, Wong e Ng (2005) demonstraram uma ação inibitória sobre a proliferação de células leucêmicas e ausência de propriedades antifúngicas para esta lectina.

A lectina isolada das sementes da leguminosa *Canavalia brasiliensis* (ConBr) é uma hololectina e apresenta 99% de homologia na seqüência de aminoácidos com a lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA) de mesma especificidade a glicose/manose (BARBOSA *et al.,* 2001; SANZ-APARICIO *et al*., 1997) . Consiste de uma banda maior de 30KDa de pequenos fragmentos de 16KDa e 12KDa (GRANJEIRO *et al*., 1997).

Lectinas da subtribo de Diocleinae têm estruturas primárias muito semelhantes, mas uma pequena diferença na sequência de aminoácidos da estrutura primária, podem levar a uma mudança na conformação da estrutura quaternária e resultar em diferentes atividades biológicas (GADELHA et al., 2005). Quando comparada com a ConBr, a CgL apresentou diferenças nos aminoácidos nas posições 21, 151, 155 e 192, respectivamente (Fig.4).

Já foram demonstrados diversos efeitos biológicos envolvendo a ConBr, como: indução de edema de pata (BENTO *et al*., 1993), estimulação de macrófagos peritoneais e liberação de peróxido de hidrogênio em camundongos (RODRIGUEZ *et al*., 1992), liberação de histamina por mastócitos de hamster e ratos (WYCZÓLKOWSKA *et al*., 1988; GOMES *et al*., 1994; FERREIRA *et al*., 1996; LOPES *et al*., 2005) e estimulação de linfócitos humanos *in vitro* (BARRAL-NETTO *et al.,* 1992). Também foi descrito que a ConBr pode induzir ativação de linfócitos e apoptose (BARBOSA *et al*., 2001), indução da produção de óxido nítrico *in vivo* e *in vitro* por células peritoneais murinas e por macrófagos (ANDRADE *et al*., 1999) e proteção parcial *in vivo* em animais infectados com *Leishmania amazonensis* (BARRAL-NETO *et al.,* 1996). Quando administrada centralmente, a ConBr possui efeito antidepressivo, que depende da sua interação com as vias serotoninérgica, noradrenérgica e dopaminérgica (BARAUNA *et al*., 2006). Em modelo de peritonite, esta lectina administrada intraperitonealmente estimulou a migração de neutrófilos (BENTO *et al*., 1993), mas por via endovenosa não demonstrou eficácia em inibir a migração neutrofílica induzida por carragenina (ASSREUY *et al*., 1997).

```
ConBr    ADTIVAVELDTYPNTDIGDFSYPHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNGKVGTAHIIYNSVGKR 60
CGL      ADTIVAVELDTYPNTDIGDPNYPHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNGKVGTAHIIYNSVGKR 60
ConBr    LSAVVSYPNGDSATVSYDVDLDNVLPEWVRVGLSASTGLYKETNTILSWSFTSKLKSNST 120
CGL      LSAVVSYPNGDSATVSYDVDLDNVLPEWVRVGLSASTGLYKETNTILSWSFTSKLKSNST 120
ConBr    HETNALHFMFNQFSKDQKDLILQGDATTGTEGNIRLTRVSSNGSPQGSSVGRALFYAPVH 180
CGL      HETNALHFMFNQFSKDQKDLILQGDATTGTDGNIELTRVSSNGSPQGSSVGRALFYAPVH 180
ConBr    IWESSAVVASFEATFTFLIKSPDSHPADGIAFFISNIDSSIPSGSTGRLLGLFPDAN 237
CGL      IWESSAVVASFDATFTFLIKSPDSHPADGIAFFISNIDSSIPSGSTGRLLGLFPDAN 237
```

Figura 4 – Estrutura primária das lectinas de *Canavalia gladiata* e *Canavalia brasiliensis.* Aminoácidos mudados: 21 – CGL (Asparagina) ConBr (Serina); 151 – CGL (ácido aspártico) ConBr (ácido glutâmico); 155 – CGL (ácido glutâmico) ConBr (arginina); 192 - CGL (ácido aspártico) ConBr (ácido glutâmico).

1.6 Resposta inflamatória

A inflamação é uma resposta complexa de defesa de um tecido vivo em especial de tecidos vascularizados contra estímulos agressores, na tentativa de destruir, imobilizar ou diluir o agente lesivo. Essa reação envolve várias alterações locais, como por exemplo: dilatação de arteríolas, capilares e vênulas, aumento do fluxo sanguíneo acompanhado de alterações na permeabilidade vascular, exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas para o espaço extravascular (eventos vasculares) e migração de leucócitos para o foco inflamatório (eventos celulares) (ROCHA e SILVA, 1978; SEDGWICK e WILLOUGHBY, 1985).

O processo inflamatório ocorre em duas fases. A primeira que é desencadeada logo após a infecção (inflamação aguda), caracterizada por infiltrado predominantemente neutrofílico; e outra que depende ou não da resolução do processo na fase aguda (inflamação crônica), caracterizada pela presença de macrófagos e linfócitos, além de angiogênese e proliferação de tecido conjuntivo. Clinicamente, a inflamação aguda apresenta algumas características específicas resultantes das alterações vasculares e celulares que o tecido sofre. Essas alterações foram inicialmente descritas por Cornelius Celsus, no início da era cristã como os quatro sinais cardinais da inflamação: dor, calor, tumor e rubor. Posteriormente, no século XIX, Virchow introduziu a perda de função do órgão lesionado como sendo o quinto sinal cardinal (SEDGWICK e WILLOUGHBY, 1985).

As respostas vasculares e celulares na fase aguda ou crônica são mediadas por fatores químicos derivados do plasma (fatores do complemento e bradicinina) ou de células (histamina, serotonina, prostaglandinas, fator ativador de plaquetas, leucotrienos e citocinas). Esta substâncias denominadas mediadores da inflamação, são formadas concomitantemente ou sequencialmente à resposta inflamatória no local da injúria, e atuam amplificando e influenciando a evolução desta resposta (BAUHMANN e GAULDIE, 1994). O processo inflamatório fica então resolvido quando o estímulo agressor é removido e os mediadores se dissipam ou são inibidos.

1.6.1 Eventos vasculares da resposta inflamatória

Os eventos vasculares ocorrem na microcirculação. Inicialmente, há uma vasoconstrição transitória seguida de vasodilatação, que é responsável pelo aumento do fluxo sanguíneo, o que provoca calor e eritema. Posteriormente, ocorre a estase sanguínea decorrente do aumento de permeabilidade da microvasculatura, uma vez que o extravasamento de líquidos e proteínas para o interstício provoca hemoconcentação aumentando a viscosidade sanguínea e reduzindo a velocidade da circulação. Esses eventos são causados pela ligação dos mediadores a receptores específicos localizados nas células alvo, e conseqüente indução de uma resposta (BHANDARI *et al.,* 2005).

A vasodilatação pode ocorrer por ação dos mediadores inflamatórios produzidos no plasma e/ou pela interação do microorganismo com células teciduais que são sintetizados e liberados principalmente ao nível das arteríolas. Dentre os mediadores envolvidos estão aqueles de origem plasmática, como a bradicinina, e substâncias de origem tecidual, como a histamina, serotonina (5-HT), as prostaglandinas da série E (PGE) e a prostaciclina (PGI_2) (PALMER *et al*., 1987).

Alguns desses mediadores, como a bradicinina, causam dilatação induzindo a liberação de fatores de relaxamento vascular derivados do endotélio (EDRFs). Já foi demonstrado que o óxido nítrico (NO) é um dos EDRFs liberados pelas células endoteliais (PALMER *et al.,* 1987; MONCADA *et al.,* 1991), que participa do controle do fluxo sangüíneo (FORTES *et al.,* 1994), da expressão de

moléculas de adesão e da permeabilidade vascular induzida pelo fator ativador de plaquetas (PAF) e pela própria bradicinina (MAYHAN, 1992).

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. Já a carragenina promove a liberação de uma série de mediadores químicos, como histamina, serotonina, bradicinina também numa fase inicial, e óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGE), interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF-α) numa fase tardia, induzindo um edema rico em infiltrado celular (SALVEMINI *et al*., 1999; KATZ *et al*., 1984).

1.6.2 Mediadores inflamatórios

Os eventos inflamatórios, em qualquer fase do processo, podem sofrer influência de substâncias do plasma sanguíneo ou de células que se encontram no foco inflamatório, sejam elas residentes ou não. Essas substâncias quando inibidas ou estimuladas podem modular negativamente ou positivamente a inflamação. Em alguns casos isso se torna necessário, pois quando o processo inflamatório persiste, pode ocorrer um estado patológico com lesão de células normais do hospedeiro.

Histamina e serotonina são mediadores essenciais para o desenvolvimento dos eventos vasculares (vasodilatação e aumento de permeabilidade vascular) e celulares (migração de leucócitos) da resposta inflamatória (MARONE *et al.*, 2002). A Histamina é estocada nos grânulos citoplasmáticos de mastócitos, basófilos e plaquetas, sendo liberada como resposta a vários estímulos, como: choques traumáticos e térmicos; reações imunes, que envolvam a ligação de anticorpos aos mastócitos; fragmentos de complementos; proteínas liberadoras de histamina derivadas de leucócitos; neuro peptídeos e citocinas (SERAFIN e AUSTEN, 1987)

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 H_1, H_2, H_3 e H_4 (MARONE *et al*., 2002). Dentre seus efeitos estão dilatação das

arteríolas, aumento da permeabilidade vascular e vasoconstrição venular (ROBBINS *et al*., 1994).

A serotonina (5-HT) é um neuromediador encontrado no sistema nervoso central, onde desempenha várias funções relacionadas com humor, sono, apetite, percepção da dor, reflexo de vômito, regulação da temperatura e da pressão arterial. Fora do sistema nervoso central, a serotonina está presente em plaquetas, linfócitos, monócitos, células neuroendócrinas pulmonares e células enterocromafins. Já foram identificados mais de 16 diferentes sub-tipos de receptores para a serotonina, relacionados com as mais diferentes funções (MOSSNER e LESCH, 1998). Dentre estas, destaca-se sua atuação no sistema imune e na resposta inflamatória. A 5-HT em altas concentrações (superiores a 3 μM) parece atuar nos receptores 5-HT_1 e 5-HT_2 facilitando a ativação de macrófagos, bem como a conseqüente proliferação de células T (YOUNG *et al*., 1993; YOUNG e MATTHEWS, 1995).

O fator ativador plaquetário (PAF) é um outro mediador derivado dos fosfolipídios de membranas por ativação das fosfolipases (PLA_2) e é sintetizado por uma variedade de células, como: mastócitos, basófilos, neutrófilos e plaquetas. Além de estimular as plaquetas, o PAF causa aumento da permeabilidade vascular, agregação e adesão de leucócitos, quimiotaxia e estimulação de outros mediadores (BRAQUET *et al.,* 1987).

As citocinas são polipeptídios envolvidos nas respostas imunológicas e que desempenham papéis importantes na resposta inflamatória. São produzidas por vários tipos celulares, como os linfócitos e macrófagos ativados. As principais citocinas mediadoras de inflamação são a IL-1, o TNF-alfa, a interleucina 6 (IL-6) e a interleucina 8 (IL-8). Dentre as muitas propriedades biológicas da IL-1, a síntese de prostaglandinas é a mais importante. Contribuindo efetivamente para a indução dos efeitos sistêmicos desta citocina, tais como: febre, aumento da síntese e liberação de PGE2, aumento da síntese e secreção de proteínas da fase aguda e aumento da expressão de moléculas de adesão nas células aumentando o acúmulo de neutrófilos nos sítios de inflamação, causando edema e induzindo secreção de outras citocinas, como TNF-alfa, IL-6 e IL-8 (MIZEL, 1989).

Assim como IL-1 e TNF-alfa, a IL-6 é um excelente exemplo de uma citocina multifuncional capaz de mediar diferentes respostas do hospedeiro por ação em múltiplos tipos celulares. Uma série de evidências tem indicado que a IL-6 desempenha um importante papel na indução e propagação da resposta inflamatória (MIZEL, 1989).

A IL-8 é secretada por monócitos, macrófagos, células endoteliais, linfócitos T e fibroblastos. A IL-8 tem sido indicada por diversos pesquisadores como um importante mediador pró-inflamatório, desencadeando eventos tais como liberação de histamina e degranulação de neutrófilos (LINDLEY *et al*., 1988). Além de seus efeitos pró-inflamatórios, tem-se atribuído a IL-8 atividades antiinflamatórias. Foi demonstrado que a IL-8 age como inibidor da adesão de neutrófilos a monocamadas de endotélio humano ativadas por citocinas (GIMBRONE *et al.*, 1989)

PGE e PGI2 são importantes mediadores da vasodilatação inflamatória. São metabólitos do ácido araquidônico formados através da ativação da via das ciclooxigenases. As prostaglandinas causam vasodilatação e potencializam a formação de edema (SPRINGER-, 1994) . A PGE causa contração do músculo liso brônquico e gastrointestinal (via EP_1); relaxamento do músculo liso brônquico, vascular e gastrointestinal (via EP_2); e contração do músculo liso intestinal (via EP_3) (RANG, *et al*., 1995). A PGI_2 é um potente vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária, que contribui para a manutenção da homeostase vascular (MONCADA *et al*., 1976).

Em 1980, Furchgott e Zawadzki, realizaram os primeiros experimentos que contribuíram para elucidar o papel fisiológico do endotélio. Estes pesquisadores notaram que aortas isoladas de coelho apresentavam relaxamento quando expostas a acetilcolina, apenas na presença de endotélio. Com isto ficou óbvio que a resposta dependente do endotélio era mediada pela liberação de várias substâncias que se difundiam, denominadas posteriormente de fatores relaxantes derivados de endotélio (EDRFs) (FELETOU e VANHOUTT, 1988; MONCADA et al., 1991; SHIMOKAWA, 1999).

O primeiro EDRF identificado foi o NO, responsável por desempenhar papel importante na regulação do tônus vasomotor (MONCADA *et al*., 1991). O NO

funciona como um anti-aterogênico, inibe a agregação plaquetária, adesão de plaquetas e leucócitos ao endotélio, proliferação de células do músculo liso vascular e apoptose de células endoteliaias (KARAKI *et al*., 1997). O NO é sintetizado a partir da combinação da L-arginina e do oxigênio molecular pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), tendo como principais cofatores o NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo associado ao grupo fosfato e íon hidrogênio) e o BH_4 (tetrabiopterina). Há três diferentes isoformas de NOS, a endotelial (eNOS) e a neuronal (nNOS), que são formas constitutivas e dependentes de cálcio para suas atividades, e a forma induzível (iNOS), que não depende de cálcio e é induzida por macrófagos ativados por citocinas pró-inflamatórias ou por endotoxinas (NATHAN, 1997; THIEMERMAN, 1997).

A bradicinina é um nonapeptídeo vasoativo liberado pelo sistema cinina, que aumenta a permeabilidade vascular, gera contração da musculatura lisa, induz relaxamento dependente de endotélio, causa hiperpolarização dependente de endotélio e relaxamento que é devido a difusão do EDHF, diferente do NO e da PGI_2 (FELETOU e VANHOUTTE, 1988).

1.7 Contratilidade

O mecanismo contrátil do músculo liso vascular é de grande importância para o conhecimento dos papéis funcionais, fisiológicos e fisiopatológicos do mesmo. Nesse contexto, é essencial a utilização de ferramentas farmacológicas mais seletivas para estudos de seus mecanismos regulatórios.

O músculo liso vascular, geralmente, opera em um estado de tensão devido à pressão que o sangue exerce sobre a parede dos vasos. Este estado é conhecido como tônus, a partir do qual ele pode contrair ou relaxar, induzindo desta forma um aumento ou diminuição da pressão no interior do vaso, dependendo do estímulo ou da função fisiológica. O equilíbrio do tônus basal é regulado pela concentração de cálcio intracelular ($[Ca^{+2}]_i$). A $[Ca^{+2}]_i$ é modulada por mecanismos intrínsecos ou miogênicos, assim como por estímulos neurohormonais, excitatórios ou inibitórios. Entre as substâncias que modulam o estado contrátil do vaso, estão

as secretadas pelas células endoteliais (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980; MONCADA *et al.*, 1991; KNOT *et al.,* 1996).

A contração do músculo liso é, geralmente, iniciada por uma elevação da concentração do cálcio (Ca^{+2}) livre no citoplasma da célula. Quando a célula é estimulada a concentração de Ca^{+2} no citosol varia de 140nM para 500-700nM (WILLIAMS e FAY, 1986). O aumento na $[Ca^{+2}]_i$ induz a ativação da calmodulina CaM, que ao ser ativada pelo Ca^{+2}, interage com a miosina quinase de cadeia leve (MCLK). Este complexo Ca^{+2}-CaM-MCLK é o primeiro estimulo para a contração, sendo responsável pela fosforilação da miosina de cadeia leve (MCL20), permitindo sua fixação ao filamento de actina e consequente contração muscular (ALLEN e WALSH, 1994; KARAKI *et al.,* 1997).

No entanto, a contração pode ocorrer sem que haja uma elevação na $[Ca^{+2}]_i$. O processo contrátil pode ser deflagrado tanto pelo aumento da sensibilidade da maquinaria contrátil ao Ca^{+2} quanto pela ativação direta das proteínas responsáveis pela contração por proteínas quinase. Apesar do mecanismo mais amplamente aceito em termos de regulação da contração do músculo liso ser o da ativação da MCLK dependente da $[Ca^{+2}]_i$, evidências sugerem que esta relação é variável e que alguns estímulos podem ativar a MCLK independente da $[Ca^{+2}]_i$ (FENG *et al*., 1999).

A sensibilidade ao íon Ca^{+2} pode ser alterada por dois mecanismos. O primeiro é a diminuição da sensibilidade ao Ca^{+2}, no qual, a dessensibilização a este íon parece proteger a célula dos efeitos adversos resultantes do aumento prolongado na $[Ca^{+2}]_i$. O segundo mecanismo propõe que há um aumento na sensibilidade ao Ca^{+2}, dependente de agonista, ativando proteínas ligadas a guanina trifosfato, estando a proteína quinase C (PKC) envolvida neste aumento de sensibilidade. A PKC estaria envolvida na inibição da atividade da miosina fosfatase de cadeia leve (MCLP) e no aumento da atividade da MCLK (IKEBE e BROZOVICK, 1996; NISHIMURA *et al*., 1991).

A reversão da contração ocorre com a diminuição na $[Ca^{+2}]_i$, deste modo levando à dissociação entre a calmodulina e a MCLK. Assim como através da atividade da MCLP, que ao ser ativada, desfosforila a molécula de miosina de cadeia

leve, pois miosina fosforilada é responsável pela manutenção da contração, levando ao relaxamento muscular. Deste modo podemos afirmar que a modulação da contração ocorre por uma série de fatores, sendo que os mais importantes são os que controlam a $[Ca^{+2}]_i$ e os que modificam a relação MLCK/MLCP independente da $[Ca^{+2}]_i$ (ALESSI *et al.,* 1992; KARAKI *et al.,* 1997).

Está demonstrado que na superfície das células existem glicoproteinas, inclusive nas células endoteliais (SHARON e LIS, 2001). Como referidas anteriormente muitas lectinas induzem a atividade mitogênica de células, sendo que neste processo ocorre a ativação de várias proteínas quinase (MAPK, MEK) (ADAM, 1995) que também atuam na modulação do processo contrátil do músculo liso.

Muitos compostos vasoativos endógenos cruciais como prostaciclina, tromboxano, óxido nítrico, endotelina, angiotensina, fator hiperpolarizante derivado do endotélio, radicais livres e bradicinina modulam as funções das células endoteliais, que influenciam o tônus do músculo liso vascular e as células sangüíneas circulantes. Estas substâncias fazem parte um complexo e equilibrado sistema de interação entre células, mediadores inflamatórios e músculo liso vascular (VAPAATALO e MERVAALA, 2001).

1.7.1. Fatores Relaxantes Derivados do Endotélio

Os vários fatores que são produzidos pelas células endoteliais difundem-se ou são liberadas, tanto para o sangue como para as outras camadas do vaso. Dessa forma, eles podem controlar funções das células musculares lisas e das células circulantes que participam das funções regulatórias atribuídas ao endotélio (SILVA, 2006).

Uma dessas funções consiste no controle do tônus da musculatura lisa vascular pela produção de mediadores que podem produzir vasodilatação ou vasoconstrição. Os principais fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDE) são o óxido nítrico (NO), o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) e a prostaciclina (CARVALHO et al., 2001).

O endotélio produz o óxido nítrico a partir da ação da enzima NO-sintetase (NOS) sobre o substrato L-arginina, com formação de NO e L-citrulina. O NO difunde-se para o interior das células musculares lisas, onde interage com o átomo de ferro do grupo heme da molécula de guanilato ciclase, levando à ativação dessa enzima; essa enzima ativada, por sua vez, atua sobre o trifosfato de guanosina (GTP), transformando-o no composto ativado monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). O aumento da concentração de GMPc nas células musculares leva à diminuição do cálcio intracelular e ao conseqüente relaxamento do vaso. Sob condições basais, o NO é continuamente liberado pelas células endoteliais saudáveis (SILVA, 2006).

A participação da prostaciclina no fenômeno de vasodilatação dependente do endotélio depende da presença de receptores prostanóides na parede das células musculares lisas vasculares. A estimulação de tais receptores ativa a adenil-ciclase, produzindo aumento do AMP-cíclico, que ativa a proteína quinase dependente do AMP no músculo liso. Tal ativação estimula os canais de potássio sensíveis ao ATP, induzindo hiperpolarização celular e maior saída de cálcio do citosol, inibindo, dessa forma, a contratilidade celular (AMODEO, HEIMANN, 2003).

O EDHF produz hiperpolarização no músculo liso vascular, resistente a inibidores da ciclooxigenase e da NOS. Esse tipo de relaxamento dependente do endotélio é observado sem nenhum aumento nos níveis intracelulares de nucleotídeos cíclicos (GMPc e AMPc) nas células musculares lisas (MOMBOULI, VANHOUTTE, 1997). Seu efeito vasodilatador é mediado pela ativação de canais de K+ na musculatura lisa vascular que hiperpolariza a membrana e diminui a concentração de Ca2+ no interior da célula muscular lisa do vaso. O tipo de canal de potássio ativado ainda não está complemente elucidado, mas canais de K+ ativados por Ca2+ parecem estar envolvidos (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 1999).

2 JUSTIFICATIVA

A proposta deste trabalho visa investigar as atividades de duas lectinas pertencentes a subtribo Dicleinae sobre eventos vasculares da inflamação *in vivo* (edema e permeabilidade vascular) e sobre a contratilidade do músculo liso vascular *in vitro*. Além disso, estabelecer comparações entre as mesmas e possíveis diferenças ou semelhanças de interações com a liberação de mediadores inflamatórios e resíduos de açúcares. A fundamentação da proposta é baseada em dois principais aspectos claramente descritos pela literatura. O primeiro é funcional e diz respeito à demonstração do papel de lectinas de leguminosas no processo inflamatório via interação com estruturas glicanas e ativação/inibição de mediadores infamatórios. O segundo aspecto é estrutural e se refere à demonstração de que lectinas de Diocleinae, embora com diferentes afinidades de reconhecimento a carboidratos, apresentam elevado grau de homologia entre as suas seqüências de aminoácidos, e que à despeito dessas semelhanças, elicitam diferentes atividades biológicas, ou ainda para uma dada atividade, diferentes perfis de resposta.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar experimentalmente em ratos a atividade de duas lectinas obtidas de sementes das leguminosas *Canavalia Brasilienses* e *Canavalia gladiata* sobre aspectos vasculares da inflamação aguda *in vivo* e sobre a atividade relaxante do músculo liso vascular *in vitro*, analisando e comparando seus mecanismos de ação.

3.2 Específicos

3.2.1 Avaliação dos efeitos das lectinas *in vivo*:

- Estudar a capacidade de indução de edema de pata;
- Estudar o efeito inibitório sobre o edema de pata induzido por estímulos inflamatórios dependentes (Cg) ou não de leucócitos (dextrana);
- Estudar a capacidade de induzir o aumento de permeabilidade vascular;
- Estudar o envolvimento de mediadores inflamatórios no efeito das lectinas, através do bloqueio farmacológico dos principais mediadores envolvidos;
- Investigar a participação de resíduos de carboidratos no efeito das lectinas através da associação destas a seus açúcares ligantes;

3.2.2 Avaliação do efeito das lectinas *in vitro*:

- Determinar a atividade sobre o músculo liso vascular de aorta isolada no tônus basal ou no estado contraído por agonistas na presença ou ausência do endotélio;
- Estudar o envolvimento de fatores relaxantes derivados do endotélio e/ou de canais iônicos no efeito das lectinas, através de bloqueio farmacológico;
- Investigar a participação de resíduos de carboidratos no efeito das lectinas através da associação destas com seus açúcares ligantes e não ligantes.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (150 e 300g) procedentes do Biotério Central do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantidos no Biotério do Laboratório de Fisio-Farmacologia da Inflamação (LAFFIN) da Universidade Estadual do Ceará (UECE). Estes animais receberam ração e água *ad libitum,* sob condições adequadas de luz e temperatura, os quais foram manipulados de acordo com os padrões éticos estabelecidos pelo comitê de ética da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

4.2 Lectinas utilizadas

As lectinas foram isoladas das espécies de plantas superiores pertencentes a família Leguminosae, subfamília Papiloneidae*,* Tribo Phaseoleae, Subtribo Diocleinea:

Canavalia brasilienses MART- feijão bravo do Ceará;

Canavalia gladiata DC (Jacq.) – feijão espada.

O isolamento e purificação foram realizados no Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC).

4.3 Drogas e reagentes

Azul de Evans – Sigma Chemical

Fenilefrina – Sigma Chemical

Indometacina (cápsulas, 25mg; Indocid) – Prodome

L-nitro-arginina metil ester za– Sigma Chemical

Manose – Sigma Chemical

Serotonina – Sigma Chemical

Tetraetilamônio – Sigma Chemical

Ácido Niflúmico (NFA) - Sigma Chemical

N-acetilglicosamina – Sigma Chemical

4.4 Caracterização das atividades biológicas das lectinas de *Canavalia brasilienses* e *Canavalia gladiata* em modelos experimentais de inflamação

4.4.1 Descrição do Modelo de Edema de Pata em ratos

Este modelo foi utilizado para avaliar a capacidade das lectinas em induzir o edema de pata e o aumento de permeabilidade vascular, bem como para o estudo do envolvimento de mediadores inflamatórios e resíduos de carboidratos no efeito das lectinas.

a) Parâmetro Edema

Os volumes de líquidos deslocados pelas patas direitas de cada animal foram medidos pletismograficamente antes da injeção dos estímulos inflamatórios (tempo zero) e 30 min e 1, 2, 3 e 4 h após a injeção dos estímulos inflamatórios. O edema foi calculado como a diferença entre o volume das patas em um determinado tempo após o estímulo e antes do estímulo (tempo zero). As áreas sob as curvas (ASC) foram calculadas usando o método do trapézio (LANDUCCI *et al.,* 1995). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias e comparados àqueles obtidos das patas dos animais injetados somente com os estímulos inflamatórios.

Para a avaliação da atividade edematogênica, os animais receberam as lectinas como estímulo por via s.c. intraplantar nas doses de 0,01; 0,1 e 1 mg/kg. O grupo controle negativo de edema foi administrado apenas com salina s.c.

b) Parâmetro Permeabilidade Vascular

Para avaliar o efeito das lectinas sobre o aumento da permeabilidade vascular foi utilizado o protocolo sugerido por GARCIA-LEME e WILHELM (1975).

Os animais foram administrados com Azul de Evans (25 mg/Kg) por via intrapeniana. Após 30 min cada animal recebeu o estímulo inflamatório CgL ou ConBr (1 mg/Kg) ou salina estéril (0,01 mL/100g de peso corporal) por via s.c. intraplantar. Passados 30 min da administração destes foi realizado o sacrifício dos animais por deslocamento cervical, sendo então as patas seccionadas logo abaixo do maléolo, pesadas e incubadas em 1mL de formamida concentrada, à temperatura de 36^0C por 72h.

Em seguida, para se quantificar o Azul de Evans extraído dos tecidos foi realizada a leitura das densidades ópticas (por espectrofotometria, A 600nm) do sobrenadante da solução previamente incubada. Os dados obtidos em absorbância foram convertidos em μg do azul de Evans, através da regressão linear baseado em uma curva padrão. Os resultados foram calculados em μg de azul de Evans/g pata.

c) Estudo da participação de mediadores inflamatórios

Na investigação da participação de mediadores inflamatórios no edema de pata induzido pelas lectinas de CgL e ConBr, foram utilizados os antagonistas, listados abaixo, tendo sido os mesmos administrados 30 ou 60 minutos antes da administração das lectinas (1mg/Kg) contidos em 0,01 mL/Kg de peso corporal de salina estéril.

- indometacina (INDO; 5 mg/kg;s.c.), inibidor de prostaglandinas (LEMOS *et al.*, 2002);
- ácido niflúmico (NFA; 30mg/kg i.p.), inibidor de canais de cloreto (FEITOSA e cols., 2002; DI ROSA e cols., 1971);
- L-nitro-arginina metil ester (L-NAME; 30 mg/kg; e.v.), inibidor da síntese de óxido nítrico (CUZZOCREA *et al.*, 1997);

4.4.2 Investigação da participação de resíduos de carboidratos nas ações das lectinas na inflamação

Os animais receberam a solução das lectinas (1 mg/Kg) juntamente com seu açúcar ligante. As soluções de lectina foram pré incubadas com seu açúcar ligante manose (0,1M) à 37°C 1h antes de sua administração. Esse procedimento garante a ocupação do domínio lectínico pelo seu açúcar conjugado.

Os grupos controles receberam a CgL (1 mg/Kg) ou ConBr (1mg/Kg) ou manose (0,1M) isoladamente.

4.4.3 Modelo de contratilidade: anéis isolados de aorta

1) Descrição do modelo:

Os animais foram sacrificados por concussão cerebral. A seguir, a região torácica foi aberta cirurgicamente para exposição, retirada e dissecação da artéria aorta. A mesma foi preparada como anéis de 2-3mm, após a remoção de gordura e tecido conectivo. O tecido foi mantido em solução fisiológica de Tyrode, a 37^0C e pH 7.4 até o momento de sua utilização. Em seguida, os anéis foram colocados verticalmente em uma câmara muscular com capacidade de 10 mL, contendo solução nutritiva aerada com mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% CO_2) e mantidos à 37^0C e pH 7.4. Uma das extremidades da preparação foi presa a uma base fixa e a outra a um transdutor de força isométrico ligado ao sistema computadorizado

(Powerlab, AD Instruments) de aquisição de dados. Os registros e análises das contrações foram realizados utilizando o programa Chart®(versão 4.1).

Nos experimentos realizados com ausência de endotélio, a superfície íntima dos anéis de aorta foi friccionada (ZHENG e cols.,1994). Para avaliação da preservação do endotélio foi adicionado ACh [10^{-6}M] (FURCHGOTT e ZAWADZKI, 1980) sobre os tecidos contraídos por fenilefrina [0,1μM], sendo a ausência de relaxamento interpretada como ausência de endotélio, mas só foram considerados endotelizados aqueles que apresentaram relaxamento maior que 75% .

O tecido foi submetido a uma tensão passiva de 2g e estabilizado por um período de aproximadamente 1 hora (h) (MATEO e ARTIÑANO, 2001).

2) Protocolo experimental

Efeito no estado contraído: Após 40 minutos de estabilização, a CgL e a ConBr foram adicionadas sobre aortas endotelizadas pré contraídas com fenilefrina [0,1μM] em concentrações cumulativas (1-100μg/mL) em intervalos de 10 minutos. No início e ao final de cada experimento foi adicionado KCl [60mM] para avaliar a responsividade dos tecidos. Este protocolo foi realizado com tecidos endotelizados e não endotelizados.

Efeito sobre o tônus: Após 40 minutos de estabilização, foram adicionadas concentrações cumulativas (1-100μg/mL) da CgL e ConBr em aortas endotelizadas. Antes e após o experimento foi adicionado KCl [60mM] para verificar a responsividade do tecido.

Avaliação da participação dos mediadores: Para o estudo do mecanismo dos efeitos vasoativos das lectinas, anéis de aorta endotelizada foram incubados por 30 min com bloqueadores farmacológicos indometacina [10μM], L-NAME [100μM] e TEA [1mM] dos principais agentes vasodilatadores endoteliais (prostaciclina, óxido nítrico e fator hiperpolarizante derivado do endotélio).

Avaliação da participação do domínio lectínico: Nos experimentos para avaliar se a atividade das lectinas é mediada via interação de seu domínio lectínico

com carboidratos presentes na célula endotelial, estas foram incubadas com seu açúcar ligante específico ou não ligante na proporção 1/10 durante 1h antes de ser adicionada ao banho, neste protocolo foram utilizadas concentrações de 1-100µg/ml das lectinas.

4.5 Análise Estatística

De todos os experimentos foram calculadas as médias ± E.PM. de um certo número de eventos (n) por grupo. As diferenças estatísticas entre os grupos foram obtidas através da análise de variância (ANOVA) e teste de Ducan para múltiplas comparações, onde $P < 0,05$ foi fixado para indicar significância estatística.

5 RESULTADOS

5.1 Efeito edematogênico das lectinas de *Canavalia gladiata* e *Canavalia brasiliensis*

As lectinas de *C. gladiata* (CgL) e *C. brasiliensis* (ConBr), administradas por via subcutânea intraplantar, induziram edema de pata nas três doses testadas (0,01; 0,1 e 1mg/Kg) de maneira dose-dependente (Fig. 5). A CgL provocou um aumento de 1,8X (0,36±0,05), 2,5X (0,46±0,06) e 4X (0,64±0,05) respectivamente, quando comparado com o grupo controle (Salina; 20,68±3,24). Já a ConBr provocou um aumento de 1,5X (0,31±0,04); 1,8X (0,37±0,05) e 6X (0,92±0,09), respectivamente, em relação ao controle (21,20±3,20) (Figs. 5a-d). A dose mais efetiva para ambas as lectinas foi a de 1 mg/Kg, tendo sido a dose escolhida para realizar os experimentos posteriores.

As lectinas em estudo apresentaram um curso temporal de desenvolvimento de edema similar até 8h, com pico inicial aos 30 minutos após sua administração seguido de um decréscimo na atividade. Entretanto, 24 horas após, o efeito edematogênico das duas lectinas ainda era significante (Fig. 5e).

5.2 As lectinas de *Canavalia gladiata* e *Canavalia brasiliensis* induzem aumento de permeabilidade vascular

A injeção s.c. intraplantar de CgL (1mg/Kg) e ConBr (1mg/Kg) induziu, no pico da ação edematogênica destas, ou seja, 30 minutos após sua administração, um aumento significativo da permeabilidade vascular, de 3X (11,75±1,65) e 7X (24,09±5,24), respectivamente ($p<0,05$) quando comparado aos animais controle (2,99±0,72), que receberam o mesmo volume de salina (Fig. 6).

Este dado confirma a capacidade pró-inflamatória das lectinas utilizadas através da quantidade de proteína plasmática extravasada para os tecidos da pata, como indicador indireto de aumento de permeabilidade vascular.

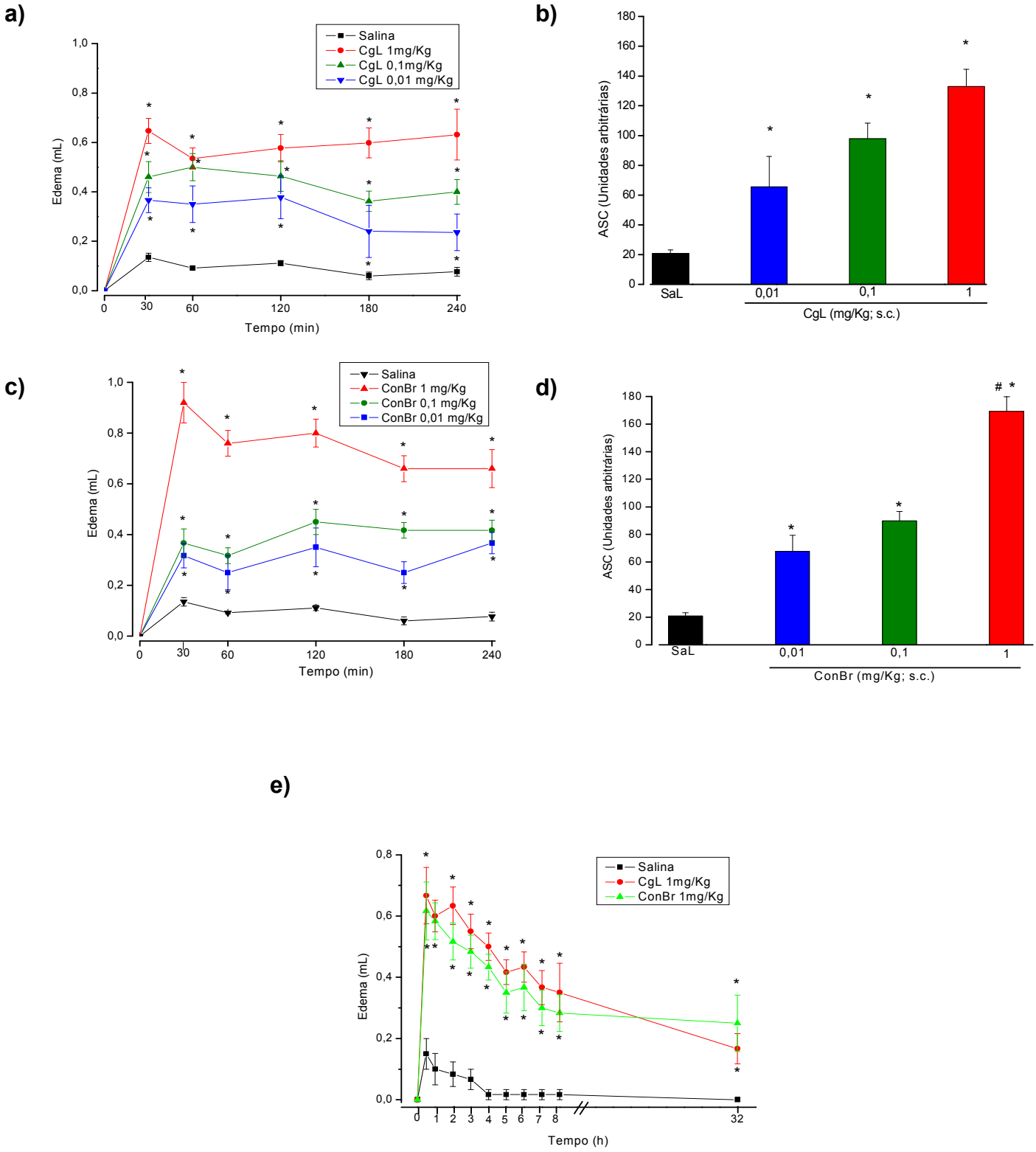


Figura 5. As lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* induzem edema de pata. As lectinas foram administradas (0,01; 0,1 e 1 mg/Kg; s.c.) na pata traseira direita de ratos. O controle negativo recebeu salina (0,01 mL/Kg; s.c.) na pata contralateral. O edema foi medido antes (tempo zero) e 30, 60, 120, 180 e 240 min após a injeção das lectinas e calculado pela variação dos volumes das patas (mL) entre os vários tempos e o tempo zero (Figs. 3a, 3c e 3e). As áreas sob as curvas (ASC) foram determinadas pelo método do trapézio (Figs. 3b e 3d). Resultados expressos como Média ±E.P.M. (n=6) (Figs. 3a, 3c e 3e). * $p<0,05$ comparado ao grupo Salina. CgL e ConBr: lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis*.

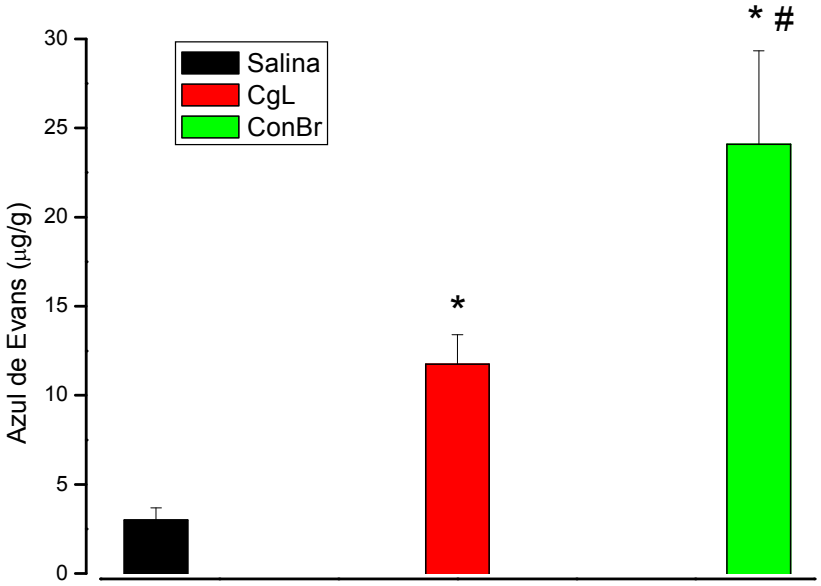


Figura 5. As lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* induzem aumento de permeabilidade vascular em pata de ratos. Os animais receberam CgL(n=6) ou ConBr (n=6) na dose de 1 mg/Kg s.c. ou salina (n=6) (controle negativo) (0,1 mL/Kg). Trinta minutos após, os animais receberam azul de Evans (25 mg/Kg, e.v.) e foram sacrificados após 1h. Resultados expressos como média ± E.P.M (n=6) de µg de azul de Evans/g/ pata. *p<0,05 em relação à Salina. CgL e ConBr: lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis*.

5.3 Participação do domínio lectínico no efeito edematogênico das lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis*

A administração subcutânea de CgL ou ConBr, ambas na dose de 1mg/Kg, associadas com seu açúcar ligante glicose (0,1M) preveniu o efeito edematogênico produzido pela administração isolada das lectinas (Fig. 7a e 7c). O efeito inibitório da CgL (0,58±0,02) foi cerca de 81% (0,10±0,02) e o da ConBr (0,62±0,01) em torno de 79% (0,14±0,026), ambos na 4ª hora. Por outro lado, a administração subcutânea de CgL ou ConBr, ambas na dose de 1mg/Kg, associadas com o açúcar não ligante GlicNac (0,1M) não inibiu o efeito edematogênico produzido pela administração isolada das lectinas (Fig 7b e 7d). Estes achados confirmam as informações obtidas na literatura que mostram inúmeras atividades biológicas de lectinas através da interação com outros sistemas via sítios de ligação à carboidratos.

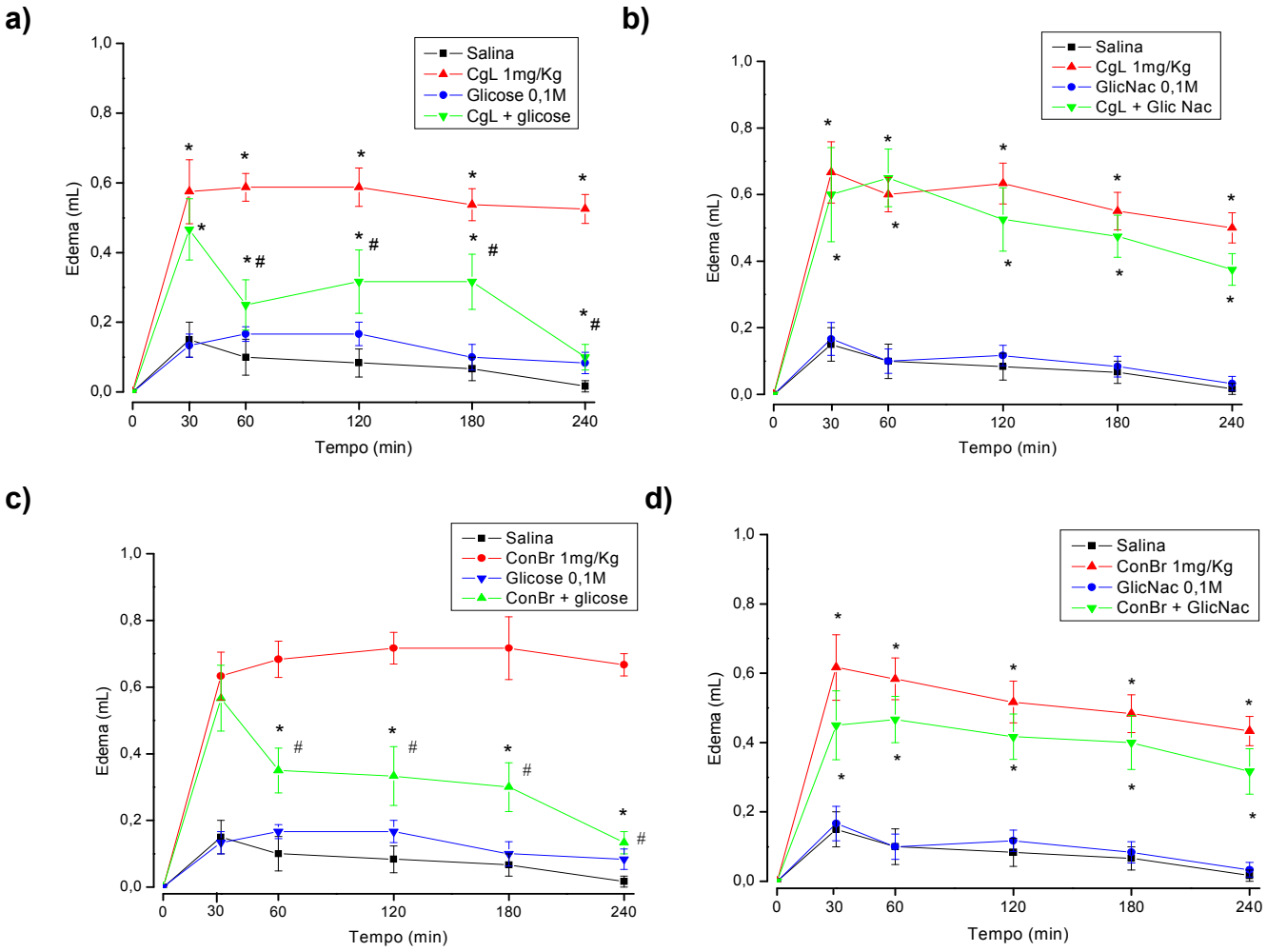


Figura 7. A atividade edematogênica das lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* é inibida pela ocupação do sítio lectínico com glicose. As lectinas foram administradas sozinhas (controle positivo) ou em associação com 0,1M de glicose (a, c) ou GlicNac (b, d) nas patas dos animais. Os controles negativos receberam salina (0,01 mL/Kg; s.c.) ou glicose ou GlicNac. O edema foi medido antes (tempo zero) e 30, 60, 120, 180 e 240 min após a injeção das lectinas e calculado pela variação dos volumes das patas (mL) entre os vários tempos e o tempo zero. Resultados expressos como Média±E.P.M. (n= 6) *p<0,05 em relação à Salina. CgL e ConBr: lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis*; GlicNac: N-acetilglicosamina.

5.4 Participação de mediadores inflamatórios no efeito edematogênico das lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis*

Na investigação do tipo de mediador inflamatório envolvido no efeito edematogênico da CgL e da ConBr, os animais foram pré-tratados com três bloqueadores farmacológicos de importantes mediadores inflamatórios, 1 hora antes da administração das lectinas (1mg/kg; s.c.), de acordo com protocolos estabelecidos na literatura: indometacina (5 mg/kg; s.c.), inibidor de prostaglandinas; e ácido niflúmico (30mg/kg i.p.), inibidor de canais de cloreto; L-NAME (30 mg/kg; e.v.), inibidor da síntese de óxido nítrico.

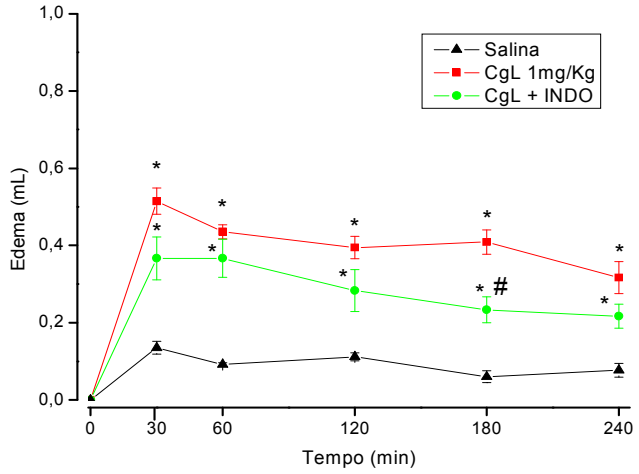
Observou-se que o edema produzido pelas lectinas ocorre com a participação de prostaglandinas (Fig. 8), canais de cloreto (Fig. 9), além de incluir o envolvimento do óxido nítrico (Fig.10).

A participação de prostaglandinas pôde ser comprovada através da reversão do efeito edematogênico após 30 min. do tratamento dos animais com indometacina (5mg/kg s.c). O edema induzido pela CgL (0,42±0,01) foi reduzido em 48% (0,23±0,03) na 3ª hora e, enquanto o edema produzido pela ConBr (0,64±0,04) foi reduzido em até 47% (0,36±0,04) na 1ª hora (Figs. 8a, b).

O envolvimento de canais de cloreto foi observado visto a reversão do efeito edematogênico das lectinas após 30 min. do tratamento dos animais com ácido niflúmico (30mg/kg i.p.). A reversão do edema provocado pela CgL (0,47±0,02)) chegou a 47% (0,23±0,03) na 2ª hora, enquanto o edema da ConBr (0,69±0,07) foi revertido em até 64% (0,29±0,06) na 3ª hora (Fig. 9a,b).

O pré-tratamento dos animais com L-NAME reduziu o edema provocado pela CgL (0,95±0,03), a partir da terceira hora em 40% (0,32±0,03), enquanto aquele produzido pela ConBr foi reduzido em 33% (0,62±0,07) em 30 minutos de experimento (Fig. 10 a,b).

a)



b)

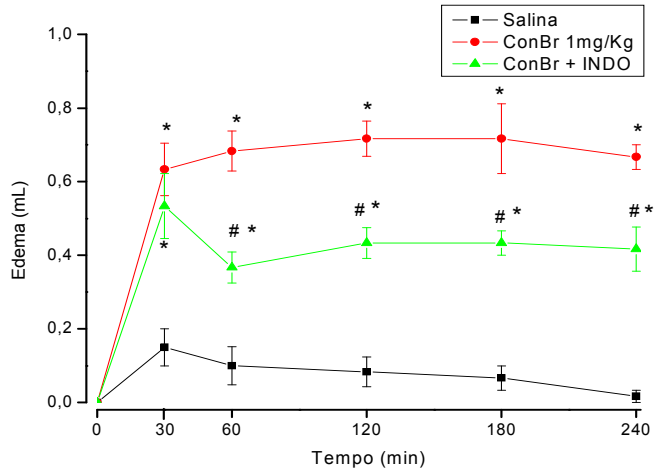


Figura 7. Indometacina inibe o edema de pata induzido pelas lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis.* As lectinas foram administradas (1mg/kg), 1 h após o tratamento com indometacina (INDO; 5mg/kg s.c). Controle negativo: salina (0,01 mL/Kg, s.c). A avaliação do edema foi feita antes (tempo zero) e 30; 60; 120; 180 e 240 min após administração das lectinas e calculado pela variação dos volumes das patas (mL) entre os vários tempos e o tempo zero. Resultados expressos como Média ±E.P.M. (n= 36) * p< 0,05 em relação a salina. # p< 0,05 em relação as lectinas. CgL e ConBr: lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis*.

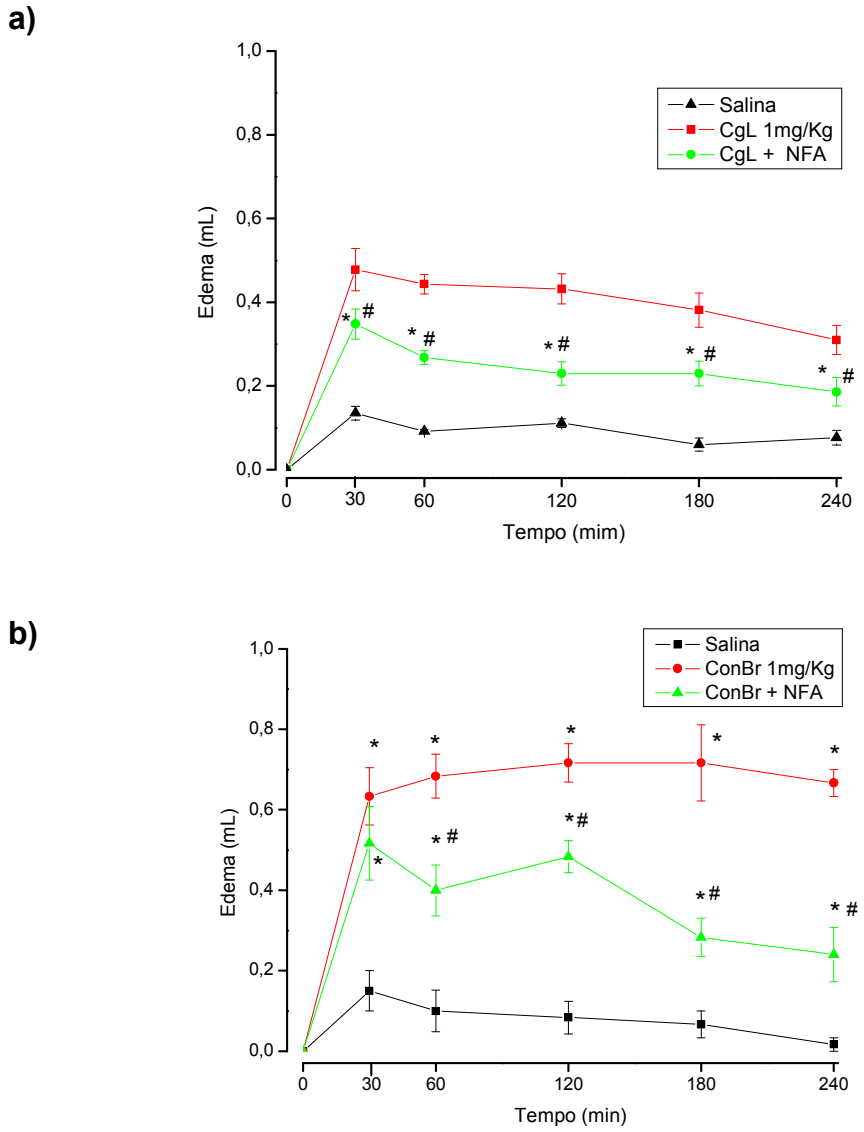


Figura 9. Ácido niflúmico inibe o edema de pata induzido pelas lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis.* As lectinas foram administradas (1mg/kg), 1 h após o NFA (30mg/kg i.p.). Controle negativo: salina (0,01 mL/Kg, s.c). A avaliação do edema foi feita antes (tempo zero) e 30; 60; 120; 180 e 240 min após a administração das lectinas e calculado pela variação dos volumes das patas (mL) entre os vários tempos e o tempo zero. Resultados expressos como Média ±E.P.M. (n= 6) * p< 0,05 em relação a Salina. # p< 0,05 em relação as lectinas. CgL e ConBr: lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis*.

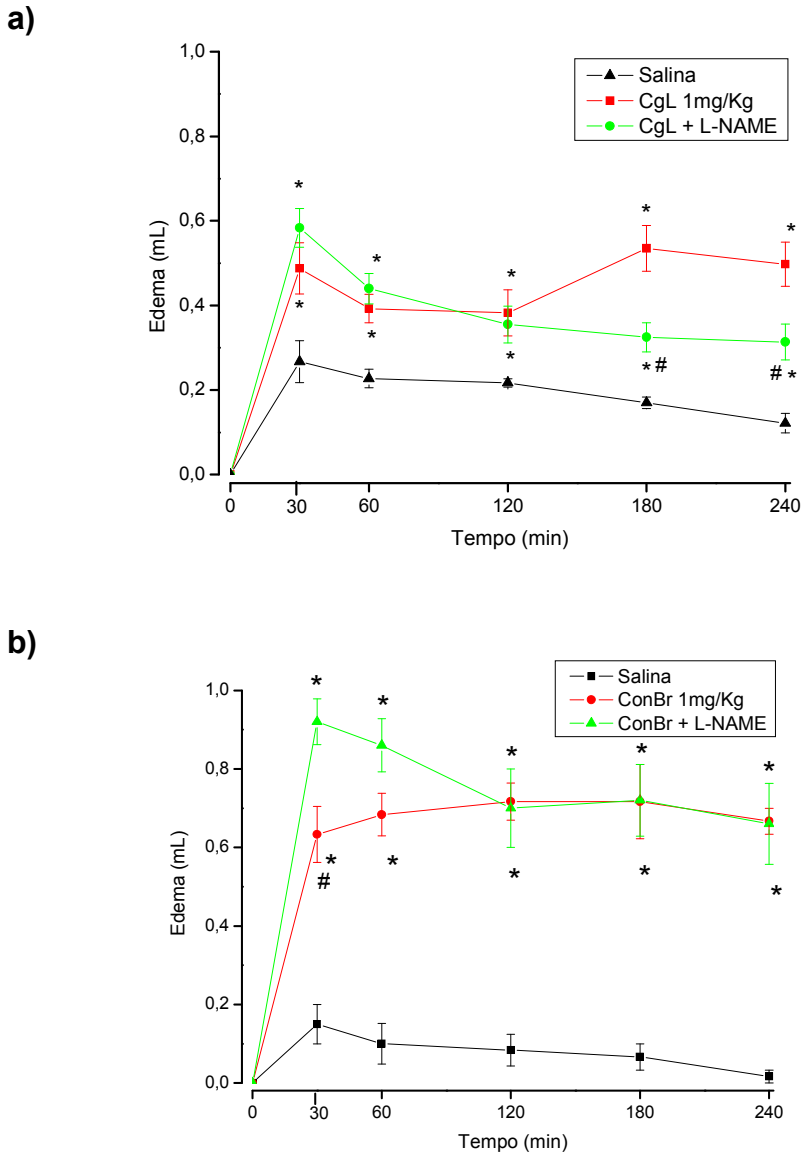


Figura 10. L-NAME inibe de forma diferenciada o edema de pata induzido pelas lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis.* As lectinas foram administradas (1mg/kg), 1 h após o tratamento com L-NAME (3mg/kg e.v.). Controle negativo: salina (0,01 mL/Kg, s.c). A avaliação do edema foi feita antes (tempo zero) e 30; 60; 120; 180 e 240 min após administração das lectinas e calculado pela variação dos volumes das patas (mL) entre os vários tempos e o tempo zero. Resultados expressos como Média ±E.P.M. (n= 6) * p< 0,05 em relação a Salina. # p< 0,05 em relação as lectinas. L-NAME: L-nitro-arginina metil ester; CgL e ConBr: lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis*.

Tabela 1. Avaliação do curso temporal do edema induzido pelas lectinas de *Canavalia gladiata* e *Canavalia brasiliensis* com bloqueadores farmacológicos.

MEDIADORES[a]					
	30'	**60'**	**120'**	**180'**	**240'**
CgL[b]	-	-	-	INDO (44%)	-
	NFA (28%)	NFA (41%)	NFA (47%)	NFA (39%)	NFA (41%)
	-	-	-	L-NAME (40%)	L-NAME (37%)
ConBr[b]	-	INDO (47%)	INDO (39%)	INDO (39%)	INDO (38%)
	-	NFA (42%)	NFA (32%)	NFA (60%)	NFA (64%)
	L-NAME (33%)	-	-	-	-

a) Mediadores do processo inflamatório e os percentuais de inibição do efeito das lectinas durante o curso temporal do edema. INDO: indometacina (5 mg/kg; s.c.); NFA: ácido niflúmico (30mg/kg i.p.); L-NAME: nitro-L- arginina metil ester (30 mg/kg; e.v.); b) CgL: lectina de *Canavalia gladiata*; ConBr: lectina de *Canavalia brasiliensis.*

5.5 As lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* relaxam aortas endotelizadas pré-contraídas com fenilefrina

A fenilefrina (Phe; 0,1μM) induziu contrações tônicas estáveis em aortas de rato, com amplitudes médias de 0,36 ± 0,05g (n=6; Fig. 11a) e 0,32 ± 0,09g (n=5; Fig. 11b) na presença de endotélio e de 0,48 ± 0,04g (n=9; Fig. 12a) e 0,64 ± 0,05g (n=6; Fig. 12b) na ausência de endotélio. Em aortas endotelizadas, a CgL e a ConBr, adicionadas cumulativamente (1-100μg/mL) sobre as contrações induzidas por Phe, induziram relaxamento significativo a partir de 10μg/mL, com efeito máximo na concentração de 100μg/mL (79,9 ± 11,98% e 73,48 ± 10,29%), respectivamente (Fig. 11a, b; 11 b). Os valores de IC_{50} calculados para as duas lectinas foram similares (Fig.11c): CgL (IC_{50}= 29,99 ± 4,43μg/mL) e ConBr (IC_{50}= 30,77 ± 5,06 μg/mL). Por outro lado, em aortas com endotélio não preservado, as lectinas não produziram resposta relaxante.

Em todos os experimentos, as lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis*, não alteraram a responsividade do tecido, visto que, após lavagem da preparação com Tyrode, a adição de KCl produziu resposta contrátil (Fig. 11a, b; 12 b).

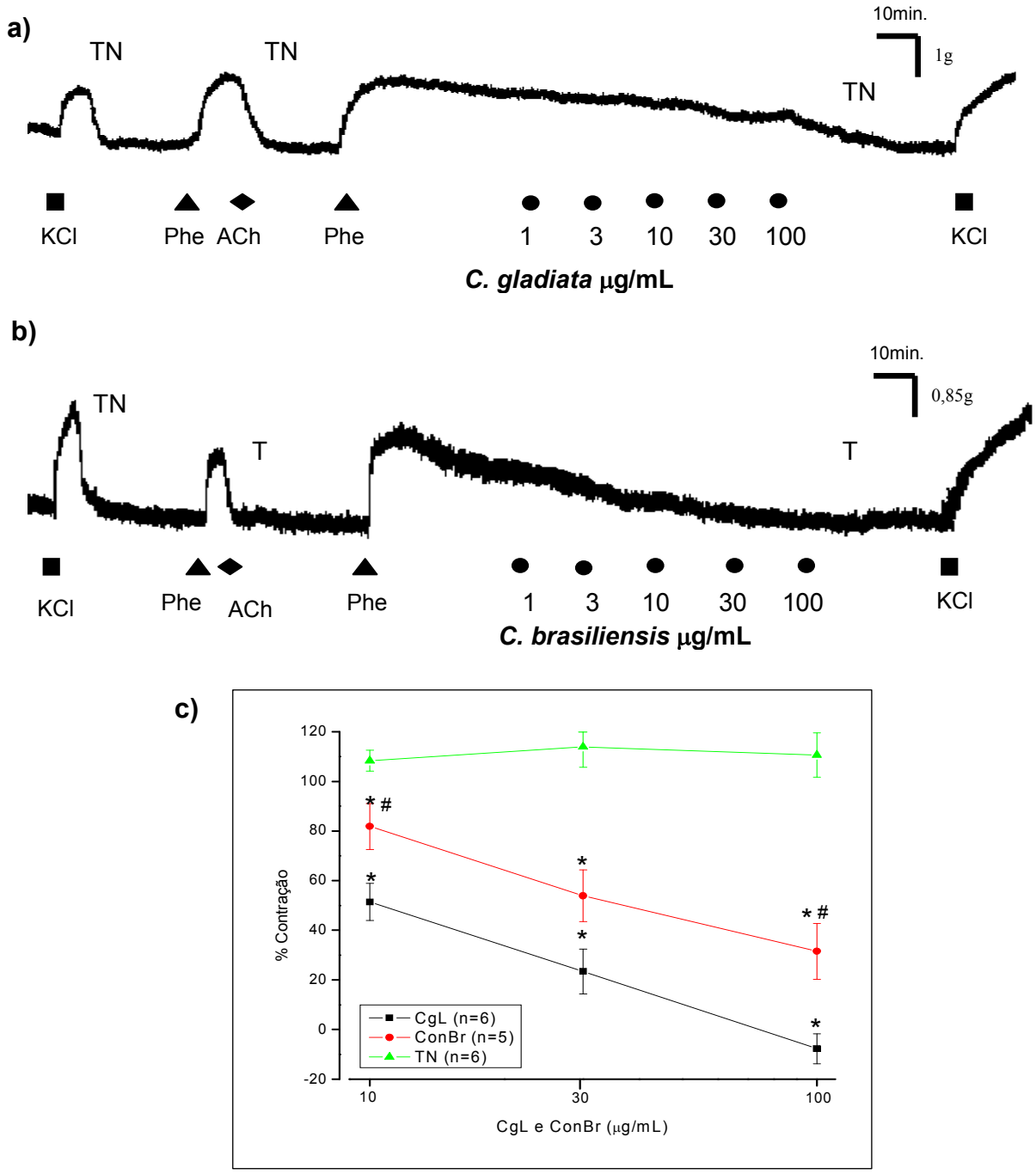


Figura 9. Efeito relaxante das lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* em aortas endotelizadas contraídas por fenilefrina. Registro típico representativo do relaxamento induzido por a) CgL (●; 1 a 100µg/mL; n=6) e b) ConBr (●; 1 a 100µg/mL; n=5); c) Gráfico da inibição da contração induzida por Phe [0,1mM] por CgL e ConBr. Resultados expressos como Média±E.P.M. * $p<0.05$ em relação ao controle (100% de contração); #$p<0,05$ em relação à ConBr. CgL e ConBr: lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis*; Phe (▲; 0,1µM): fenilefrina; ACh (◆ ; 1µM): acetilcolina; KCl (■ ; 60mM): cloreto de potássio; TN: lavagem com Tyrode.

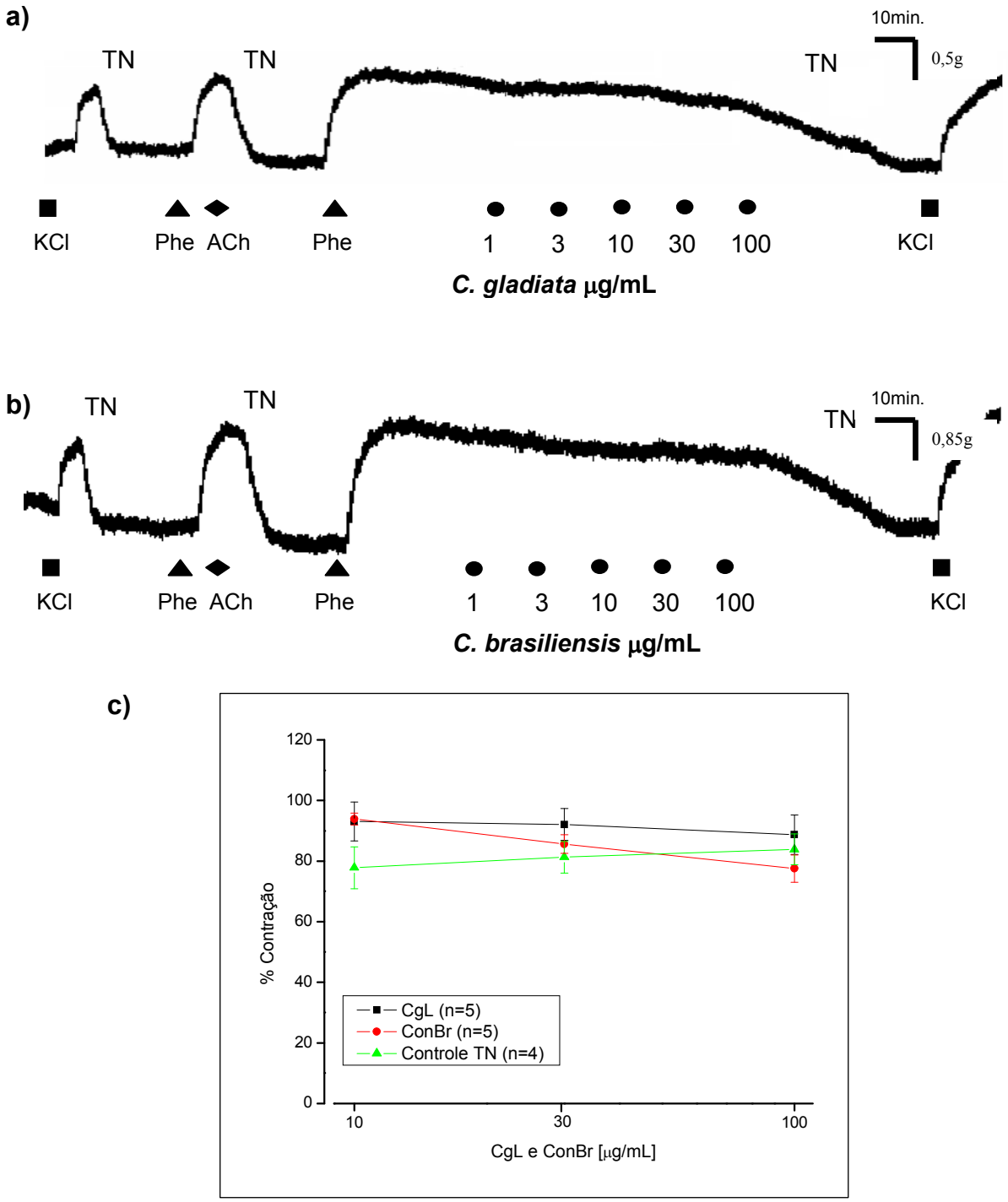


Figura 10. Ausência de efeito relaxante das lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* em anéis de aorta sem endotélio contraídas por fenilefrina. Registro típico representativo do efeito da a) CgL (●; 1 a 100µg/mL; n=5); b ConBr (●; 1 a 100µg/mL; n=5); c) Gráfico comparativo do efeito da CgL e ConBr. Resultados expressos como Média±E.P.M. CgL e ConBr: lectinas de *C. gladiatae C. brasiliensis*; Phe (▲; 0,1µM): fenilefrina; ACh (◆ ; 1µM): acetilcolina; KCl (■ ; 60mM): cloreto de potássio; TN: lavagem com Tyrode.

5.6 As lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* não alteram o tônus basal de aortas endotelizadas

Com base na ausência do efeito relaxante das lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* sobre aortas contraídas por fenilefrina, sem endotélio, avaliou-se seus efeitos sobre o tônus basal apenas de tecidos endotelizados. Após a estabilização do tecido vascular, a adição cumulativa (1 – 100µg/mL) de CgL e ConBr não alterou o tônus basal (0% de contração) dos anéis de aorta em nenhuma das concentrações utilizadas (Fig.13).

5.7 O relaxamento induzido pelas lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* em aortas endotelizadas contraídas por fenilefrina envolve o reconhecimento do domínio lectínico

Sabendo-se da importância do sítio de ligação a carboidratos para a atividade biológica das lectinas, a investigação da participação deste na atividade relaxante das lectinas demonstrou que as respostas de CgL e ConBr foram dependentes da ligação a carboidratos. A incubação das lectinas com seu açúcar ligante comum manose, antes da adição das lectinas à preparação, reverteu o efeito relaxante das mesmas: CgL = 14,90 ± 6,68% (n=5; Fig. 14 a e c); ConBr= 42,29 ± 5,28% (n=4; Fig.14b e f). Quando as lectinas foram incubadas com o açúcar não ligante N-acetil-glicosamina (GlicNac), este não alterou a resposta relaxante observada: CgL= 52,89 ± 7,65% (n=5; Fig. 14c e e); ConBr= 49,73 ± 2,97% (n=4; Fig.19d e f).

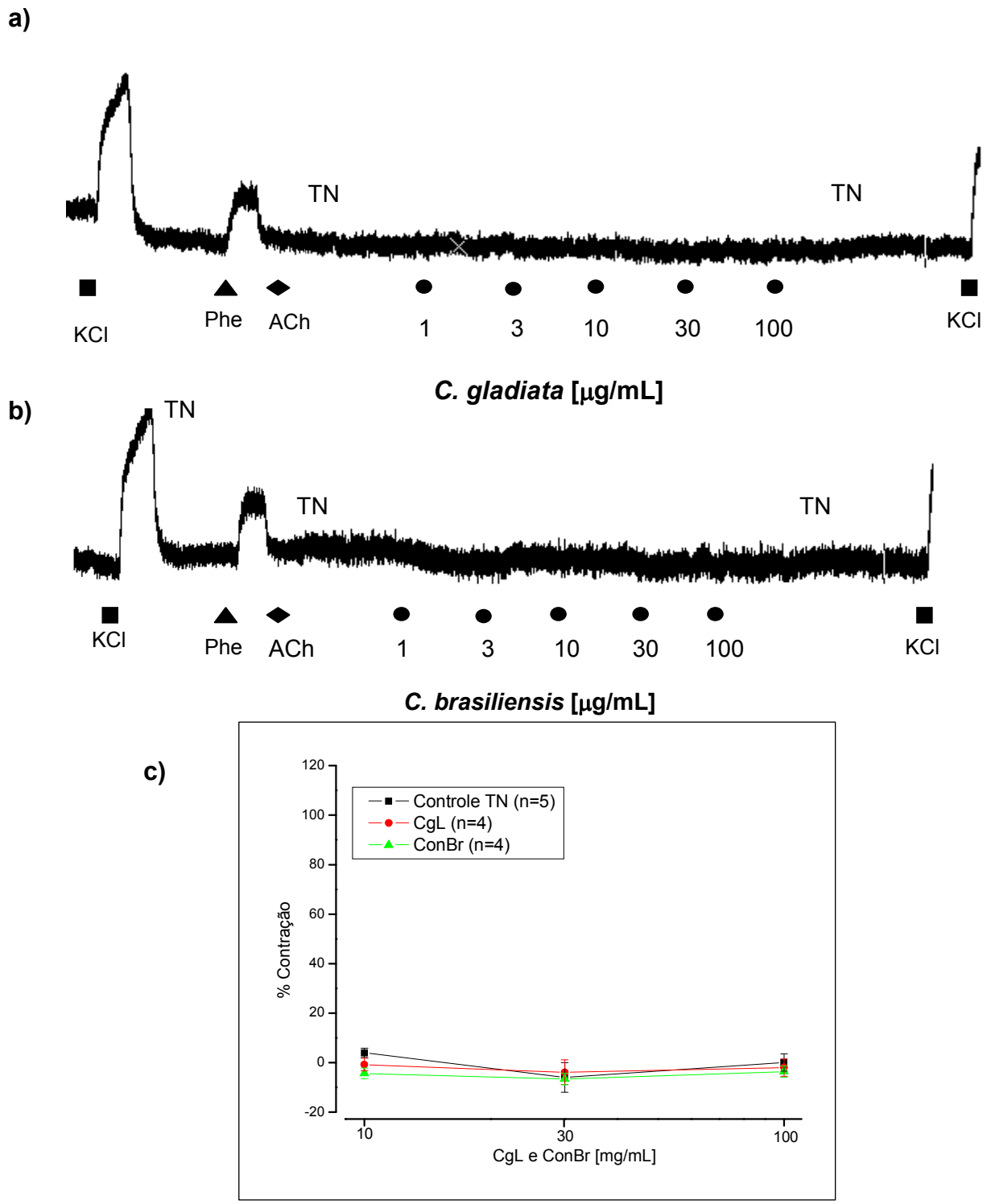
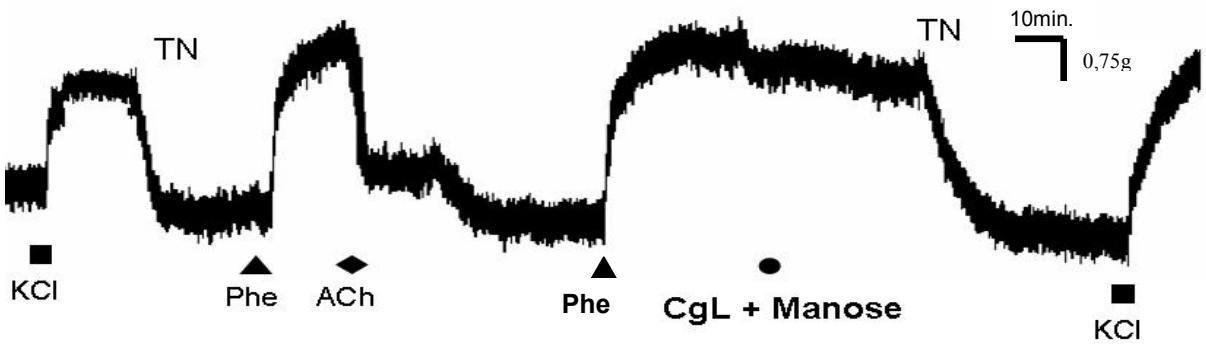
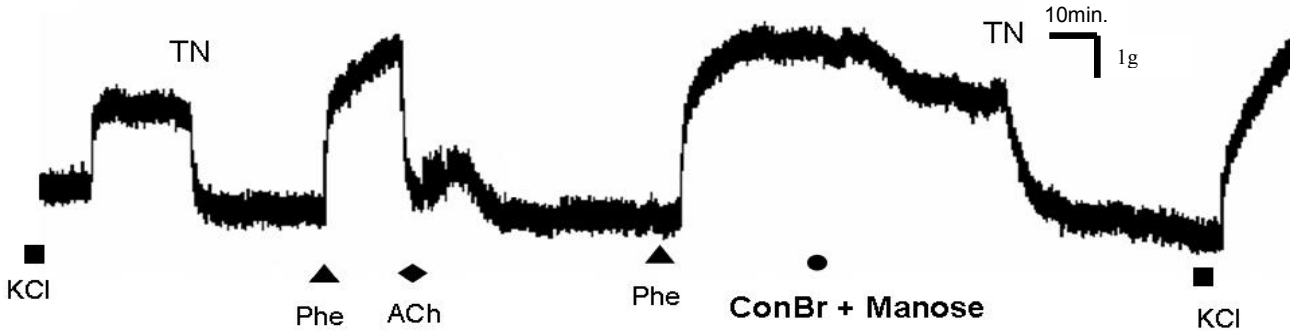


Figura 11. As lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* não alteram o tônus basal de aortas endotelizadas. Registro típico do efeito da CgL (●; 1 a 100µg/mL; n=4 e b) ConBr (●; 1 a 100µg/mL; n=4). c) gráfico comparativo do efeito da CgL e ConBr. Resultados expressos como Média±E.P.M. CgL e ConBr: lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis*; Phe (▲; 0,1µM): fenilefrina; ACh (; 1µM): acetilcolina; KCl (■ ; 60mM): cloreto de potássio; TN: lavagem com Tyrode.

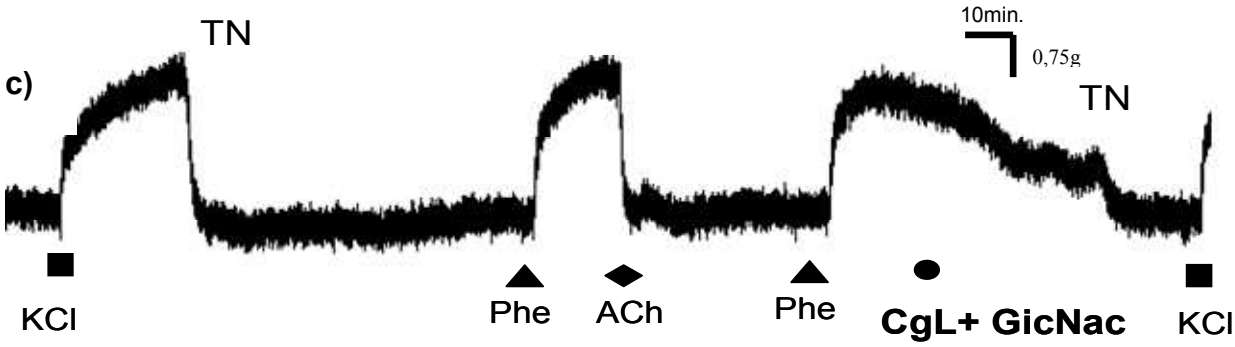
a)


TN
TN
10min.
0,75g
KCl
Phe
ACh
Phe
CgL + Manose
KCl

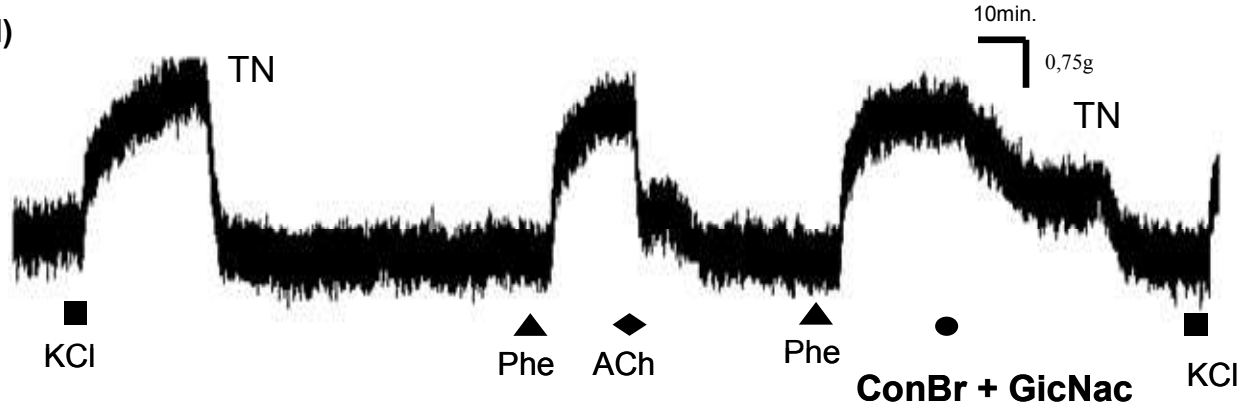
b)


TN
TN
10min.
1g
KCl
Phe
ACh
Phe
ConBr + Manose
KCl

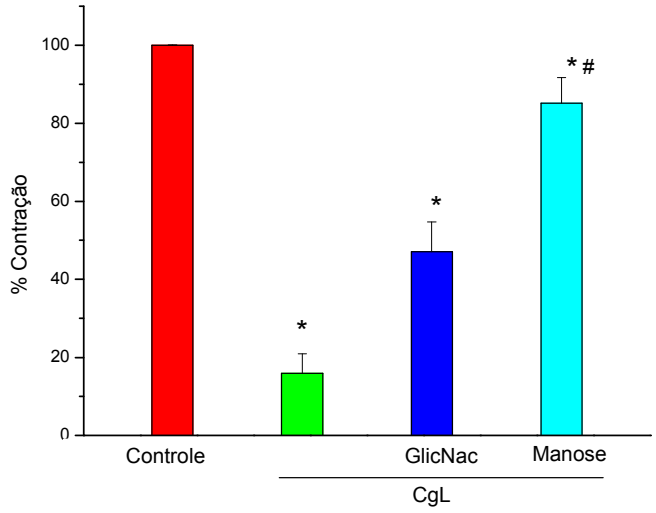
c)


TN
10min.
0,75g
TN
KCl
Phe
ACh
Phe
CgL+ GicNac
KCl

d)


10min.
0,75g
TN
TN
KCl
Phe
ACh
Phe
ConBr + GicNac
KCl

e)



f)

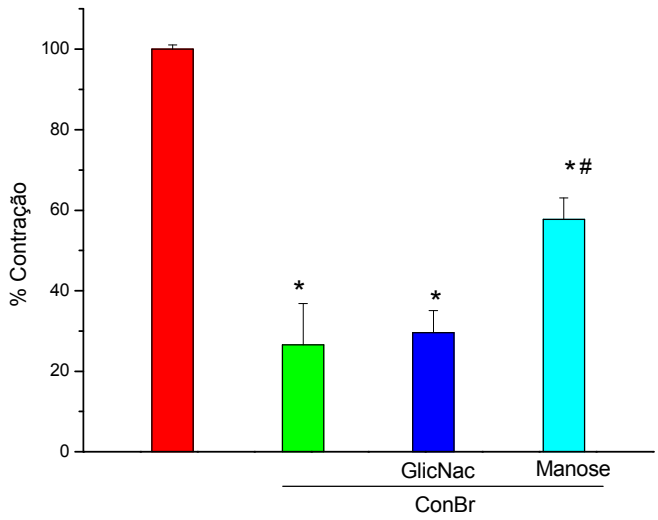


Figura 14. O relaxamento induzido pelas lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* em aortas endotelizadas contraídas por fenilefrina envolve o reconhecimento do domínio lectínico. Registro representativo da reversão do efeito da a) CgL (100μg/mL) e b) ConBr (100μg/mL) após 30 minutos de incubação a 37ºC com D-Manose 0,1M – 100μg/mL; n=4-5 e do efeito da c) CgL (100μg/mL) e d) ConBr (100μg/mL) incubadas com GlicNac (0,1M – 100μg/mL); n=4-5; Gráfico comparativo do efeito da e) CgL e f) ConBr incubadas com o açúcar ligante e não-ligante. Resultados expressos como Média ±E.P.M. *p<0.05 em relação às lectinas isoladas. CgL e ConBr: lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis*; Phe (▲; 0,1μM): fenilefrina; ACh (◆; 1μM): acetilcolina; KCl (■ ; 60mM): cloreto de potássio; TN: lavagem com Tyrode.

5. Indometacina previne o efeito relaxante das lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* sobre aortas endotelizadas contraídas por fenilefrina

Após a constatação do efeito vasorelaxante dependente de endotélio das lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis*, avaliou-se o papel da prostaciclina (um dos fatores relaxantes derivado de endotélio) na ação destas lectinas. A fenilefrina (0,1mM), em presença de indometacina [10μM] induziu contração tônica com amplitude média de 0,29 ± 0,04 (n=6; Fig. 15a) e 0,37 ± 0,11 (n=6; Fig. 15b). Na presença de indometacina, o efeito relaxante resultante da adição cumulativa tanto de CgL como de ConBr foi parcialmente revertido (Fig. 15). A reversão do efeito da CgL (Fig 15a) foi observada nas concentrações de 10μg/mL (9,75 ± 5,36), 30 μg/mL (36,22 ± 12,35%) e 100 μg/mL (56,48 ± 13,80%), enquanto o efeito da ConBr (Fig. 15b) apenas a partir de 30 μg/mL (15,05 ± 4,77%) e 100 μg/mL (32,96 ± 7,83%). No entanto, os valores de IC_{50} calculados para as duas lectinas foi semelhante: CgL+INDO: IC_{50} = 32,97 ± 4,92μg/mL; CgL: IC_{50}=29,99±4,43μg/mL (Fig. 15c) e ConBr + INDO: IC_{50} = 32,98±3,66μg/mL; ConBr: IC_{50}=30,77±5,06μg/mL (Fig. 15d). Os dados sugerem o envolvimento de prostaciclina na ação relaxante das lectinas.

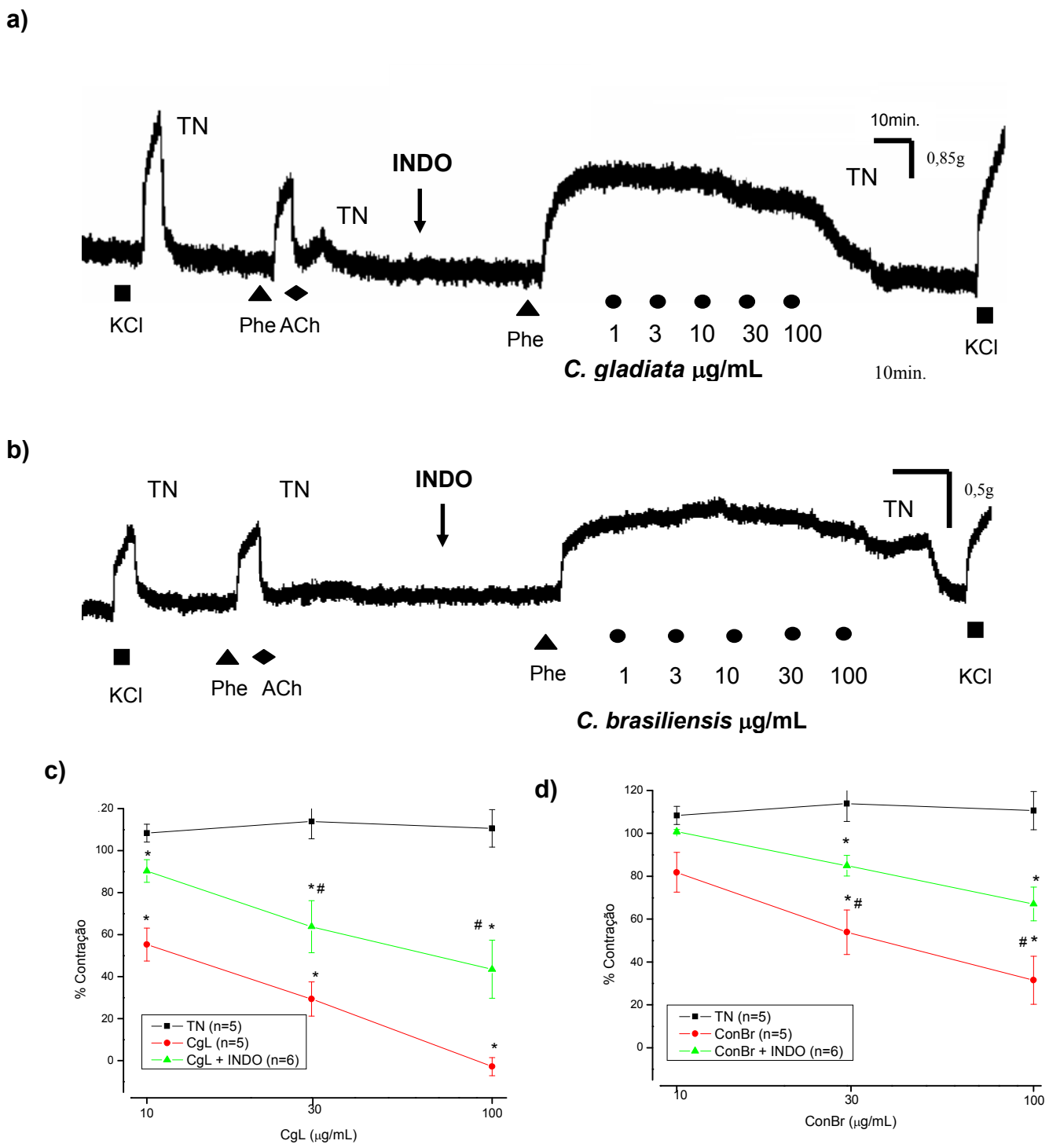


Figura 13. Indometacina reverte parcialmente o efeito relaxante das lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* em aortas endotelizadas. Registro típico representativo do efeito da a) CgL (●; 1 a 100µg/mL; n=5) e b) ConBr (●; 1 a 100µg/mL; n=5) em presença de indometacina (10µM; n=6); Gráfico da reversão do efeito relaxante da c) CgL e d) ConBr sobre as contrações induzidas por Phe [0,1mM] em presença de indometacina; Resultados expressos como Média ±E.P.M. *p<0.05 em relação aos controles; CgL e ConBr: lectinas de *C. gladiata*; e *C. brasliensis*; Phe (▲; 0,1µM): fenilefrina; ACh (◆; 1µM): acetilcolina; KCl (■ ; 60mM): cloreto de potássio; TN: lavagem com Tyrode.

5.9 Tetraetilamônio reverte parcialmente o efeito relaxante da lectina de *C. gladiata*, mas não de *C. brasiliensis* em aortas endotelizadas contraídas com fenilefrina

Avaliou-se a participação de um segundo fator endotelial, o fator hiperpolarizante derivado do endotélio na ação das lectinas. A fenilefrina (0,1mM), em presença de TEA (500μM), induziu contrações tônicas com amplitudes médias de 0,81 ± 0,12% (n=8, Fig. 16a) e 0,44 ± 0,13% (n=4, Fig. 16b). Em presença de TEA, o efeito relaxante resultante da adição cumulativa (1-100 μg/mL) de CgL foi significativamente revertido nas concentrações de 10μg/mL (13,25 ± 8,66%), 30 μg/mL (37,27 ± 12,01%) e 100 μg/mL (62,99 ± 13,19%). Por outro lado, o relaxamento promovido pela ConBr nas concentrações de 10μg/mL (88,27± 12,67%); 30 μg/mL (52,68± 15,00%) e 100 μg/mL (37,21± 13,49%) não foi alterado. Os valores de IC_{50} foram calculados: CgL+TEA (IC_{50}=32,99 ± 4,52μg/mL); CgL (IC_{50}= 29,99±4,43μg/mL) (Fig. 16c). Os dados sugerem a participação do fator hiperpolarizante derivado do endotélio no efeito relaxante da CgL, mas não da ConBr.

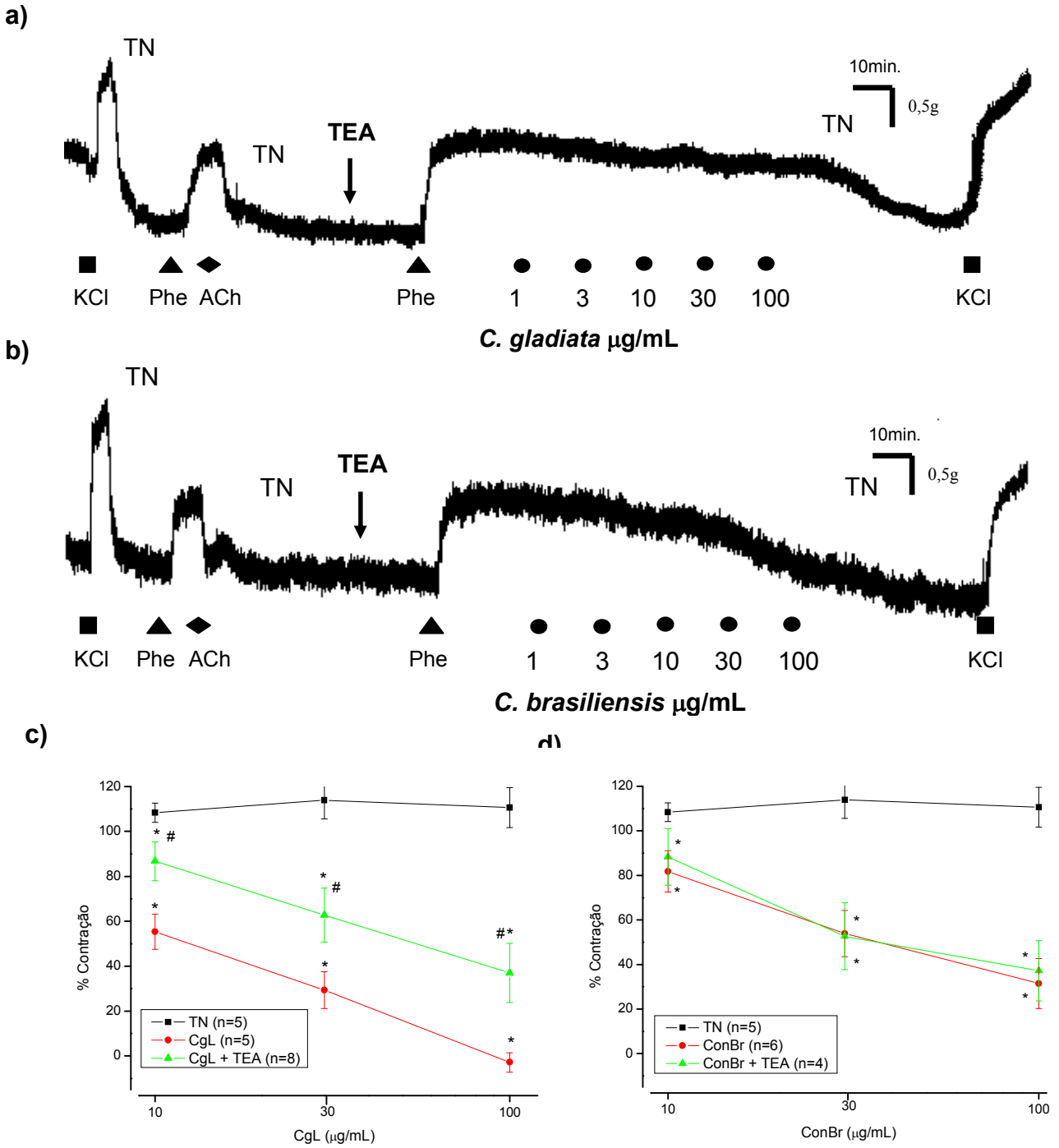


Figura 14. Tetraetilamônio reverte parcialmente o efeito relaxante das lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* em aortas endotelizadas. Registro típico representativo do efeito da a) CgL (●; 1 a 100µg/mL; n=5) e; b) ConBr (●; 1 a 100µg/mL; n=5) em presença de TEA (500µM; n=4); Gráfico da reversão do efeito relaxante da c) CgL e d) ConBr sobre as contrações induzidas por Phe [0,1mM] em presença de TEA; Resultados expressos como Média ±E.P.M. *p<0.05 em relação aos controles. CgL e ConBr: lectinas de *C gladiata* e *C. brasiliensis*; Phe (▲; 0,1µM): fenilefrina; ACh (◆; 1µM): acetilcolina; KCl (■; 60mM): cloreto de potássio; TN: lavagem com Tyrode.

5.10 L-NAME reverte o efeito das lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* em aortas endotelizadas contraídas por fenilefrina

A participação do principal fator relaxante endotelial também foi avaliada no efeito das lectinas. Em presença de L-NAME (100μM), a fenilefrina (0,1mM) induziu contração tônica de 0,88 ±0,09 (n=6, Fig. 17a) e 0,97 ± 0,03 (n=7, Fig. 17b). O efeito relaxante da CgL e da ConBr foi revertido na presença de L-NAME, sendo significativo em todas as concentrações utilizadas de CgL: 10 μg/mL (90,22 ± 6,05%), 30 μg/mL (80,18 ± 9,02%) e 100 μg/mL (80,63 ± 4,19%) e somente nas concentrações de 30 μg/mL (97,13 ± 3,15%) e 100 μg/mL (96,48 ± 2,75%) para a ConBr. Os valores de IC_{50} calculados foram: CgL + L-NAME: IC_{50}=31,08 ± 4,81μg/mL; CgL: 29,99 ± 4,43 μg/mL (Fig. 15c) e ConBr+L-NAME: IC_{50}=38,78 ± 5,81μg/mL; ConBr: IC_{50}= 30,77 ± 5,06 μg/mL (Fig. 17d). Os dados sugerem que o efeito relaxante da CgL e ConBr ocorre, pelo menos parcialmente, via ativação da enzima óxido nítrico sintase, principalmente para ConBr.

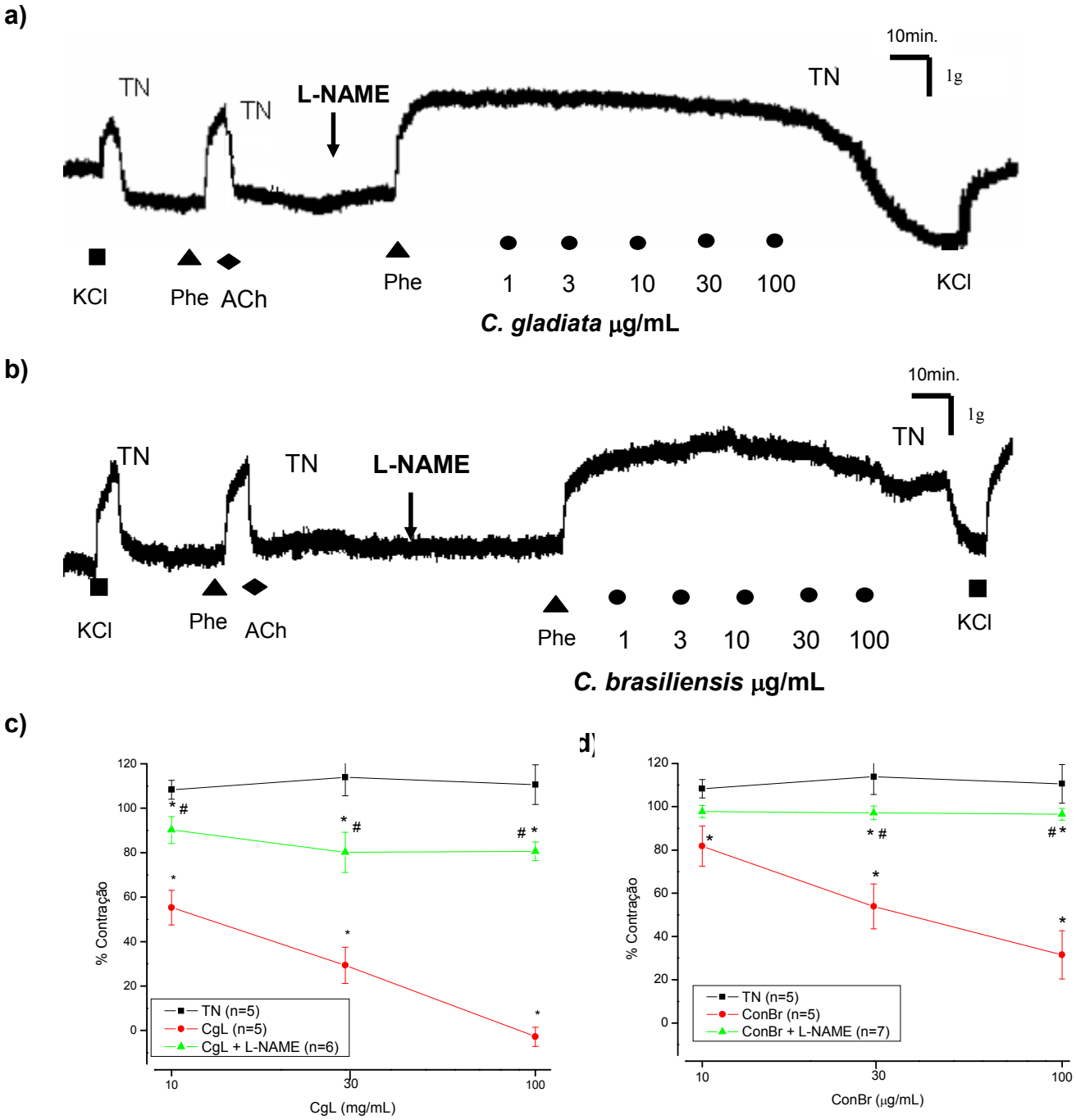


Figura 15. L-NAME reverte os efeitos relaxantes das lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis* em aortas endotelizadas contraídas por fenilefrina. Registro típico representativo do efeito da a) CgL (●; 1 a 100µg/mL; n=5) e b) ConBr (●; 1 a 100µg/mL; n=5) em presença de L-NAME (100µM; n=7); Gráfico comparativo do efeito da c) CgL e d) ConBr em presença e ausência de L-NAME. Resultados expressos como Média ±E.P.M. *p<0.05 em relação aos controles; #p<0,05 em relação à lectina. CgL e ConBr: lectinas de *C. gladiata* e *C. brasiliensis*; Phe (▲; 0,1µM): fenilefrina; ACh (◆; 1µM): acetilcolina; KCl (■ ; 60mM): cloreto de potássio; TN: lavagem com Tyrode.

Tabela 2. Avaliação do efeito relaxante das lectinas de *Canavalia gladiata* e *Canavalia brasiliensis* com diferentes bloqueadores farmacológicos.

FRDE[a]			
	10μg/mL	**30μg/mL**	**100μg/mL**
CgL[b]	INDO (33%)	INDO (31%)	INDO (38%)
	TEA (29%)	TEA (25%)	TEA (63%)
	L-NAME (32%)	L-NAME (45%)	L-NAME (72%)
ConBr[b]	-	INDO (27,5%)	INDO (32%)
	-	-	-
		L-NAME (38%)	L-NAME (58%)

a) Fatores relaxantes derivados do endotélio (FRDE) e os percentuais de reversão do efeito relaxante das lectinas nas concentrações apresentadas; INDO: indometacina (10μM); TEA: tetraetilamônio (1mM); L-NAME: nitro-L-arginina metil Ester (100μM).b) CgL: Lectina de *Canavalia gladiata*; ConBr: lectina de *Canavalia brasiliensis.*

6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstra um importante efeito vasodilatador *in vivo* e *in vitro* das lectinas de *C. brasiliensis* e *C.gladiata*, que ocorre através da interação com os domínios lectinicos.

In vivo, as lectinas apresentaram atividade edematogênica com aumento de permeabilidade vascular. Estes resultados corroboram com outros achados de atividades imunoestimulantes e inflamatórias de lectinas de plantas que foram mostrados *in vitro* (BARRAL-NETO *et al.,* 1992; MACIEL *et al.,* 2004; GOMES *et al.,* 1994) e *in vivo* (BENTO *et al.,* 1993; ALENCAR *et al.,* 2003, 2004). Aumento de permeabilidade vascular evocado por lectinas *in vitro* também foi descrito em microvasculatura (NORTHOVER E NORTHOVER, 1994).

Neste estudo, as lectinas induziram edema de pata de curta duração, com efeito máximo após os primeiros 30 min de administração, o que caracteriza tipicamente uma inflamação aguda. De fato, processos inflamatórios agudos estimulados por lectinas de *C. brasiliensis* e *C. ensiformis* (ConA) já haviam sido publicados, como: formação de edema de pata; migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de ratos (BENTO *et al.,* 1993) e liberação de histamina a partir de mastócitos (GOMES *et al.*, 1994). Estes achados sugerem que, em nosso estudo, o edema induzido pela CgL e ConBr é um edema de natureza celular. No estudo conduzido por Bento e colaboradores (1993), o efeito edematogênico da ConBr (em uma dose superior a que foi usada aqui) atingiu um pico de 6h, mantendo-se até 48h.

É importante notar que a ConBr se mostrou mais potente na indução do edema e no aumento da permeabilidade vascular quando comparada com a CgL. Dessa forma, ConBr foi mais eficiente em estimular a produção e proliferação de linfócitos, produção de INF-γ e ativação de macrófagos (BARRAL-NETO *et al.,* 1992; RODRIGUEZ *et al.,*1992).

A participação do domínio lectínico na inflamação tem sido demonstrada para muitas ações de lectinas. 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 de ligação a carboidratos na elicitação 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).

Nossos resultados mostraram que o efeito edematogênico das duas lectinas foi parcialmente revertido quando associado ao seu açúcar ligante. Estes dados confirmam a grande afinidade dessas lectinas a carboidratos (DAM et al., 1998) e indicam a estreita relação existente entre as suas ações pró-inflamatórias e envolvimento do domínio lectínico.

Em processos inflamatórios, prostaglandinas e NO são liberados simultaneamente em grandes quantidades através da ativação de enzimas induzíveis (MOLLACE *et al.,* 2005). As prostaglandinas são responsáveis pela maioria dos sintomas primários da inflamação, tais como dor, migração de neutrófilos, edema e exsudação de plasma (MENEZES *et al*., 2008). No presente trabalho, o pré-tratamento dos animais com indometacina, um bloqueador de prostaglandinas e tromboxano (VANE, 1971), não interferiu no pico do edema das lectinas. No entanto, a indometacina inibiu o efeito edematogenico da CgL na 3ª hora, e da ConBr a partir da 1ª hora e durante todo o curso temporal. Com base nestes resultados, as prostaglandinas parecem desempenhar papel importante na indução de edema e exsudação de plasma pela ConBr. Corroborando estes achados, Bento e colaboradores (1993) já haviam demonstrado o envolvimento das prostaglandinas no efeito edematogênico induzido por ConBr e ConA.

O L-NAME é uma substância reconhecida por inibir inespecificamente a atividade de todas as isoformas da enzima óxido nítrico sintase, e com isto a produção de óxido nítrico (MONCADA,1991). O pré-tratamento de ratos com o inibidor da NOS, o L-NAME (REES *et al.,* 1990), reduziu o efeito edematogênico da ConBr aos 30 minutos e da CgL na 3ª e 4ª h. Estes resultados, sugeriram uma importante participação do NO na fase tardia do edema induzido pela CgL e no pico do edema induzido pela ConBr. A literatura relata que lectinas de Diocleinae

(KESHERWANI & SODHI, 2007), incluindo *C. brasiliensis* (ANDRADE *et al.,* 1999), são capazes de estimular a produção e liberação de NO, principalmente *in vitro*.

O agente antiinflamatório ácido niflúmico (NFA) é um inibidor dual de postaglandinas e de canais de cloreto ativados por Ca^{++} (COELHO, 2004). Nossos resultados mostraram que o NFA diminuiu o efeito edematogênico suscitado pela CgL, no período correspondente ao surgimento de prostaglandinas no edema induzido por carragenina (DI ROSA *et al.,* 1971). No edema induzido pela ConBr, estes canais parecem mediar a fase final, uma vez que o ácido niflúmico mostrou melhor inibição do que a indometacina na 3 ª e à 4 ª h de desenvolvimento do edema. A mediação de canais de Cl^- ativados por Ca^{2+} na inflamação induzida por lectinas foi, pela primeira vez, claramente demonstrado neste trabalho.

In vitro, as lectinas isoladas de *C. brasiliensis* e *C.gladiata* apresentaram efeito relaxante em aortas isoladas de ratos, pré-contraídas por fenilefrina. Esse relaxamento mostrou-se estritamente dependente de endotélio e realçou a importância da interação ao seu sítio de ligação a carboidrato para ocorrência do efeito. Uma variedade de respostas vasculares de lectinas foram revertidas por seus açúcares ligantes (KLEHA *et al*., 1991, LIMA *et al.,* 2004; GADELHA *et al.,* 2005).

A nível vascular, o NO é o principal mediador do relaxamento dependente de endotélio no músculo liso vascular (FURCHGOTT & ZAWADZKI, 1980). Em nossos estudos, o efeito vasodilatador da ConBr e CgL foi completamente inibidos pelo L-NAME. De forma diferente dos experimentos *in vivo*, nesse modelo, o NO parece ser o principal responsável pelo relaxamento induzido pela ConBr.

Assim, avaliamos o envolvimento da ciclooxigenase na vasodilatação induzida pelas lectinas. A síntese de prostanóides, mediadores que produzem efeitos vasoconstritor e relaxante, é amplamente dependente de endotélio (LÜSCHER et al., 1992). Muitas substâncias estimulam a síntese e liberação de NO, que por sua vez pode suscitar na liberação de prostaciclina que é o principal produto da via das ciclooxigenases em células endoteliais vasculares (NILIUS E DROOGMANS, 2001). Em nosso estudo, o relaxamento induzido por CgL e ConBr foi bloqueado com o uso de indometacina em aortas de ratos, sugerindo assim a participação de prostaciclina. As ações inibidoras da indometacina e do L-NAME,

reforçam evidências crescentes na literatura, sobre a provável interligação entre as vias biossintéticas do NO e a via das prostaglandinas (MOLLACE *et al.*, 2005; SALVEMINI *et al.*, 1997).

Foi descrito que canais de potássio promovem bom relaxamento muscular através da hiperpolarização da membrana e subseqüentemente fechamento de canais de Ca2+ dependentes de voltagem (NELSON & QUAYLE, 1995). A ativação dos canais de potássio pode ser responsável pela libertação de EDHF pelo músculo liso vascular, e até mesmo baixas concentrações de TEA (≤ 1mM) podem bloquear esses canais (EDWARDS *et al.,* 1998). Em nossos experimentos, o TEA não inibiu a vasodilatação dependente de endotélio induzida pela ConBr, mas reduziu significativamente a vasodilatação induzida pela CgL, confirmando o envolvimento dos canais de potássio e EDHF no efeito relaxante dessas lectinas.

Nosso grupo já demonstrou o efeiro relaxante de outras lectinas em músculo liso de aortas de ratos. A lectina da alga *Bryothaminium triquetrum* (LIMA, *et al.,* 2004) e de lectinas de plantas da subtribo Diocleinae *Canavalia maritima* e ConA (GADELHA *et al.,* 2005) induziram relaxamento de músculo liso de aortas com a participação de óxido nítrico. Neste estudo, mostramos pela primeira vez a participação da prostaciclina e do EDHF no relaxamento induzido por lectinas. É importante ressaltar que apesar do elevado grau de semelhança entre as lectinas de ConBr e CgL, ambas mostraram um efeito relaxante dependente de endotélio, mas com participação diferenciada entre os vasodilatadores envolvidos.

Diferenças nas atividades biológicas de lectinas de Diocleinae já haviam sido relatadas (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992; BENTO *et al*, 2003; ANDRADE *et al.*, 1999; CAVADA *et al.,* 2001; GADELHA *et al.*, 2005). Apesar da semelhança estrutural entre as lectinas de *Canavalia,* observou-se respostas inflamatórias e relaxantes diferentes entre as lectinas de *C. brasiliensis* e *C. gladiata*. A ConBr se mostrou mais potente que a CgL na indução dessas atividades biológicas. Vários fatores podem contribuir para estas diferenças, tais como: a oligomerização dependente de pH que algumas lectinas apresentam, a posição relativa do sítio de ligação a carboidratos (WAH et al., 2001) como também mudanças mínimas em resíduos de aminoácidos localizados em posições-chaves, relacionados com a estrutura quaternária (BRINDA et al., 2004). Por exemplo, o aminoácido na posição

58, que é excepcionalmente um aspartato na ConA, mas é ocupado por glicina na *C.gladiata* (YAMAUCHI e MINAMIKAWA, 1990), *C.maritima* (PÉREZ at el., 1991) e *C.brasiliensis* pode ser determinante para os diferentes equilíbrios dímeros-tetrêmeros (CALVETE et al., 1999), além de afetar o sítio de ligação a carboidratos, tornando a estrurura quaternária da ConBr mais aberta do que da ConA (SANZ-APARICIO, 1997). Além disso, as estruturas primárias das lectinas de CgL e ConBr diferem na posição de quatro aminoácidos (Asparagina-21 para Serina-21; Ácido aspártico-151 para Ácido glutâmico-151; Ácido glutâmico-155 para Arginina-155 e Ácido aspártico-192 para Ácido glutâmico-192). Essas diferenças também podem ser relevantes para as atividades biológicas apresentadas neste trabalho. Estudos adicionais de estruturas X atividade são necessários para explicar como estas diferenças podem interferir nas referidas atividades biológicas. O isolamento dos receptores celulares envolvidos também é necessário, tanto para estudos estruturais de co-cristalização, quando para uma melhor compreensão da ação dessas proteínas.

6 CONCLUSÕES

- O presente estudo demonstrou um importante efeito vasodilatador *in vivo* e *in vitro* de duas lectinas de diferentes espécies do gênero *Canavalia*.

- Todos os efeitos ocorrerem via interação domínio lectínico.

- *In vivo*, CGL e ConBr mostraram atividade edematogênica com aumento da permeabilidade vascular

- Destaca-se a participação de canais de cloreto nos efeitos vasculares induzidos pelas lectinas.

- *In vitro*, a atividade relaxante de ambas lectinas foi totalmente dependente de endotélio.

- Apesar das semelhanças na estrutura primária das lectinas, podemos distinguir diferenças de potência e de mecanismos de ação da resposta inflamatória e relaxante de ambas lectinas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, A. Role of kinins in local and systemic inflammatory reactions. **Bull Mem Acad R Med Belg**, v. 150n. 5-6, p. 226-31, 1995.

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.

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.; 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. Vaitarea macrocarpa induces paw edema with leucocyte infiltration. **Protein Pept Lett**, v. 11, n. 2, 195-200, 2004.

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.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.

ALESSI, D.; MACDOUGALL, L. K.; SOLA, M. M.; IKEBE, M.; COHEN, P. The control of protein phosphatase-1 by targetting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is anovel form of protein phosphatase-1. **Eur. J. Biochem.**, v. 210, p. 1023-1035, 1992.

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, 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.

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.

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.***

ASSREUY, A.M.S., CALVETE, J.J., ALENCAR, N.M., CAVADA, B.S., ROCHA-FILHO, D.R., MELO, S.C., CUNHA, F.Q., RIBEIRO, R.A. Spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer and its isolated subunits induced neutrophil migration into the peritoneal cavity of rats. **Biol Reprod**, v. 67, n. 6, p. 1796-803, 2002.

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.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.

BARAUNA, S.C.; KASTER, M.P.; HECKERT, B.T.; DO NASCIMENTO, K.S.; ROSSI, F.M.; TEIXEIRA, E.H.; CAVADA, B.S.; RODRIGUES, A.L.; LEAL, R.B. Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. **Pharmacol Biochem Behav**. v. 85, p. 160-169, 2006.

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

BARONDES, S. H. Biofunctional properties of lectins: lectins redefinied. **Trends Biochem. Sci.**, v. 13, p. 480-482, 1988.

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.

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.

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

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.

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.

BHANDARI, P., BATEMAN, A.C., MEHTA, R.L.; PATEL, P. Mucosal expression of cyclooxygenase isoforms 1 and 2 is incresead with worsening damage to the gastric mucosa. **Histopathology**. V. 46, n. 3, p. 180-6, 2005.

BRAQUET, P., TOUQUI, L., SHEN, T.Y., VARGAFTIG, B.B. Perspectives in platelet-activating factor research. **Pharmacol Rev**, v. 39, p. 97-144, 1987.

CARVALHO, A.M. & SODRE FILHO, J. Uso de adubos verdes como cobertura do solo. **Boletim de Pesquisa - Embrapa Cerrados No.11.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Cerrados, Planaltina, Brazil, 2000.

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.; 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.

COBO, J.G.; BARRIOS, E.; KASS, D.C.L.; THOMAS, R. Nitrogen mineralization and crop uptake from surface-applied leaves of green manure species on a tropical volcanic-ash soil. **Biol Fertil Soils**, v. 36 , 87-92, 2002.

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.

CRUZ, M.S.D.; PEREZ URRIA, E.; MARTIN, L.; AVALOS, A.; VICENTE, C. Factors affecting germination of *Canavalia brasiliensis*, *Leucaena leucocephala*, *Clitoria ternatea* and *Calopogonium mucunoides* seeds. **Seed Science and Technology**, v. 23, p. 447-454, 1995.

CUZZOCREA, S., ZINGARELLI, B., COSTANTINO, G., SZABO, A., SALZMAN, A. L., CAPUTI, A. P., SZABO, C. Beneficial effects of 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion. **Br J Pharmacol**, v. 121, p. 1065-1074, 1997.

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 asparaginelinked oligosaccharides and differential specificities for complex carbohydrates. **J Biol Chem**, v. *273*, n. 20, p. 12082-88, 1998.

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.

EDWARDS, G., DORA, K.A., GARDENER, M.J., GARLAND, C.J., WESTON, A.H. K+ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. **Nature**, v. 396, p. 269-72, 1998.

FELETOU, M., VANHOUTTE, P.M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. Br J Pharmacol, v.93, n.3, p.515-524, 1988.

FENG, J.; ITO, M.; NISHIKAWA, M.; OKINAKA, T.; ISAKA, N.; HARTSHORNE, D.J.; NAKANO, T. Dephosphorylation of distinct sites on the 20KDa myosin light chain by smooth muscle myosin phosphatase. **FEBS**, v. 448, p. 101-104, 1999.

FERREIRA, R.R.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.; GOMES, J.C. Characteristics of the histamine release from hamster cheek pouch mast cells stimulated by lectins from Brazilian beans and concanavalin A. **Inflamm Res**, v. 45, p. 442-447, 1996.

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, 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.

FURCHGOTT, R. T.; ZAWADZKI, Z. V. The obligatory role of the endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetycholine. **Nature**, v. 288, p. 373-376, 1980.

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. & WILHELM, D.L. The effects of adrenalectomy and cortiscosterone on vascular permeability responses in the skin of the rat. **British Journal of Pathology**, v. 56, n. 5, p. 402-407, 1975.

GIMBRONE, M.A. JR., OBIN, M.S., BROCK, A.F., LUIS, E.A., HASS, P.E., HÉBERT, C.A., YIP, Y.K., LEUNG, D.W., LOWE, D.G., KOHR, W.J., *et al.* Endothelial interleukin-8: a novel inhibitor of leukocyte-endothelial interactions. **Science**, v. 246, n. 4937, p.1601-3. 1989.

GODHWANI, S., GODHWANI, J.L., VYAS, O.S. *Ocimun sanctum*: Experimental study evaluating its anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity in animals. **J Ethnopharmacol**, v. 21, p. 153-163, 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.

GRANGEIRO, T.B.; SCHRIEFER, A.; CALVETE, J.J.; RAIDA, M.; URBANKE, C.; BARRAL-NETTO, M.; CAVADA, B.S. Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. **Eur J Biochem**, v. 248, p. 43-48, 1997.

GUZMAN, S.; GATO, A.; L; CALLEJA, J.M. Anti-inflammatory, analgesic and free scavering activities of the marine microalgae *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. **Phytother Res**., v. 15, p. 224-230, 2001.

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.

IKEBE, M.; BROZOVICH, F.V. Protein kinase C increases force and slows relaxation in smooth muscle: Evidence for regulation of the myosin light chain phosphotase. **Biochem Bioph Res Co**. v. 225, n. 1182, p. 370-376, 1996.

KARAKI, H.; OZAKI, H.; HORI, M.; MITSUI-SAITO, M.; AMANO, K.; HARADA, K.; MIYAMOTO, S.; NAKAZAWA, H.; WON, K. J.; SATO, K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. **Pharmacol Rev**, v. 49, p. 157-230, 1997.

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.

KESHERWANI, V. & SODHI A. Differential activation of macrophages *in vitro* by lectin *Concanavalin A*, Phytohemagglutinin and Wheat germ agglutinin: Production and regulation of nitric oxide. **Nitric Oxide**, v. 16, p. 294–305, 2007.

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.

KNOT, H. J.; BRAYDEN, J. E.; NELSON, M. T. Calcium channels ans potassium channels. In: BARANY, M. **Biochemistry of smooth muscle contraction.** California: Academic Press, Cap. 16, p. 203-219, 1996.

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 crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A_2. **Br J Pharmacol**, v. 114, p. 578-583, 1995.

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.

LINDLEY, I., ASCHAUER, H., SEIFERT, J.M., LAM, C., BRUNOWSKY, W., KOWNATZKI, E., THELEN, M., PEVERI, P., DEWALD, B., TSCHARNER, V. VON., WALZ, A., BAGGIOLINI, M. Synthesis and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding monocyte-derived neutrophil activating factor: biological equivalence between natural and recombinant neutrophil activating factor. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 85, p. 9199–9203, 1988.

LOPES, F.C.; CAVADA, B.S.; PINTO, V.P.; SAMPAIO, A.H.; GOMES, J.C. Differential effect of plant lectins on mast cells of different origins. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, p. 935-941, 2005.

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

LÜSCHER, T.F., BOULANGER, C.M., DOHI, Y., YANG, Z.H. Endothelium-derived contracting factors. **Hypertension**, v. 19, p. 117-30, 1992.

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.

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.

MATEO, A. O.; ARTIÑANO, M. A. A. Effect of high extracellular Ca^{2+} levels in spontaneously hypertensive rat aorta. **Eur J Pharmacol,** v. 432, p. 177-185, 2001.

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, p 295-305, 1992.

MENEZES, G.B., REZENDE, R.M., PEREIRA-SILVA, P.E., KLEIN, A., CARA, D.C., FRANCISCHI, J.N. Differential involvement of cyclooxygenase isoforms in neutrophil migration in vivo and in vitro. **Eur J Pharmacol**, v. 598, p. 118-22, 2008.

MIZEL, S.B. The interleukins. **FASEB J**, v. 3, n. 12, p. 2379-88.1989

MOLLACE, V., MUSCOLI, C., MASINI, E., CUZZOCREA, S., SALVEMINI D. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. **Pharmacol Rev**, v. 57, p.17-52, 2005.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, p. 109-142, 1991.

MONCADA, S., GRYGLEWSKI, R., BURTING, S., VANE, J.R. Na enzyme isolated from arteries transforms prostagland endoperoxides to na unstable substance that inhibits platelet aggregation. Nature, v. 263, p. 663-665, 1976.

MOREIRA, R.A.; CASTELO-BRANCO, C.C.; MONTEIRO, A.C.O.; TAVARES, R. O.; BELTRAMINI, L.M. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. Seeds. **Phytochemistry**, Grã Bretanha, v. 47, p. 1183-1188, 1998.

MOREIRA, R.A. & AINOUZ, I.L. Purification of a lectin from jackfruit (*Artocarpus integrifolia* L) seeds. **Plant Physiology,** 1978.

MORENO, F.B., DELATORRE, P., FREITAS, B.T., ROCHA, B.A., SOUZA, E.P., FACO, F., CANDURI, F., CARDOSO, A.L., FREIRE, V.N., LIMA FILHO, J.L., SAMPAIO, A.H., CALVETE, J.J., DE AZEVEDO, W.F.JR., CAVADA, B.S. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the lectin from Canavalia gladiata seeds. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr**, v. 60, n. 8, p. 1493-5, 2004.

MOSSNER, R., LESCH, K.P. Role of serotonin in the immune system and in neroimmune interactions. Lesch brain, behavior, and immunity. V. 12, p. 249-271, 1998.

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, p. 824-35, 2007.

NATHAN, C. Inducible nitric oxide synthase. J. Clin. Invest. V 100, p.2417, 1997.

NELSON, M.T. & QUAYLE, J.M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. **Am J Physiol**, v. 268, p. C799-822, 1995.

NEVES, S.A.; FREITAS, A.L.; SOUSA, B.W.; ROCHA, M.L.; CORREIA, M.V.; SAMPAIO, D.A.; VIANA, G.S. Antinociceptive properties in mice of a lectin isolated from the marine alga *Amansia multifida* Lamouroux. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, p. 127-34, 2007.

NILIUS, B., DROOGMANS, G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. **Physiol Rev**, v. 81, p.1415-59, 2001.

NISHIMURA, K.; OTA, M.; ITO, K. Existence of two components in the tonic contraction of rat aorta mediated by α-adrenoceptor activation. **Br J Pharmacol**. v. 102, p. 215-221, 1991.

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. 42, p. 136-139, 1994.

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, p. 524-526, 1987.

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.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.**, v. 109, p. 347-352, 1995.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. Farmacologia. Rio de Janeiro: 5 ed., **Elsevier**, 2004.

REES, D.D., PALMER, R.M., SCHULZ, R., HODSON, H.F., Moncada, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*, v. 101, p. 746-52, 1990.

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

ROCHA E SILVA, M.O. A brief history of inflamation. Em: VANE, J.R. & FERREIRA, S.H. **Handbook of 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, p. 823-826, 1992.

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, p. 304-306, 1999.

SANZ-APARICIO, J.; HERMOSO, J.; GRANJEIRO, T.B.; CALVETE, J.; CAVADA, B.S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from concanavalin A. **FEBS Letters**, v. 405, p. 114-118, 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. **Carbohydrate Res**, v. 138, p. 315-323, 1985.

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

SERAFIN, W.E., AUSTEN, K.F. Mediators of immediate hypersensitivity reactions. **N Engl J Med**, v.317, n.1, p. 30-4, 1987.

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

SHARON, N. & LIS, H. Lectins. Encyclopedia of Life Sciences, 2001. **Nature** Publishing Group/ www.els.net.

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. Lectins--proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. **Essays Biochem**. v. 30, p.59-75, 1995.

SHARON, N. & LIS, H. Legume lectins – a large family of homologous proteins. **FASEB Journal**, v. 4, p. 3190-3208, 1990.

SHARON, N. & LIS, H. Lectins: cells aglutinating and sugar-specific proteins. **Science**, v. 177, p. 949-958, 1972.

SHIMOKAWA, H. Primary endothelial dysfunction: Atherosclerosis. **J Mol Cell Cardiol,** v. 31, p. 23-37, 1999.

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.

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.

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

VANE, J.R., Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nat New Biol**, v. 231, p. 232-5,1971.

VAN PARIJS, J.; BROEKAERT, W.E.; GOLDSTEIN, J.I. Havein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevein brasiliensis*) latex. **Planta**, v.183, p.258-262, 1991.

VAAPATALO, H.; MERVAALA, E. Clinically important factors influencing endothelial function. **Med Sci Monit**, v. 7, n. 5, p. 1075-1085, 2001.

WILLIAMS, D.A. & FAY, F.S. Calcium transients and resting levels in isolated smooth muscle cells as monitored with quin 2. **Am J Physiol**, v. 250, n. 5 p. C779-91,1986.

Wong, J.H., Ng, T.B. Lunatusin, a trypsin-stable antimicrobial peptide from lima beans (*Phaseolus lunatus* L.), **Peptides**, v. 26, p. 2086-92, 2005.

WYCZOLKOWSKA, J.; PROUVOST, A.; RYDZYNSKI, K. Lectin-induced histamine release from various populations of hamster mast cells. **Agents Actions**, v. 23, p. 217-20, 1988.

YOUNG, M.R., MATTHEWS, J.P. Serotonin regulation of T-cell subpopulations ando f macrophage accessory function. Immunology. V. 84, n. 1, p. 148-52, 1995.

YOUNG, M.R., KUT, J.L., COOGAN, M.P., WRIGHT, M.A., YOUNG, M.E., MATTHEWS, J. Stimulation of splenic T-lymphocyte function by endogenous serotonin and by low-dose exogenous serotonin. Immunology. V. 80, n. 3, p. 395-400, 1993.

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. Appl. Pharmacol.**, v. 129, p. 16-22, 1994.

ZHENG, X. F., KWAN, C. Y., DANIEL, E. E., Role of intracellular Ca^{2+} in EDRF release in rat aorta., **J Vasc. Res.,** v. 31, p.18-24, 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