

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

MÁRIO ROGÉRIO LIMA MOTA

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E
ANTINOCICEPTIVA DA LECTINA ISOLADA DE
SEMENTES DE *Lonchocarpus sericeus* (Poir.) Kunth.**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador (a): Prof^a. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar

**Fortaleza
2008**

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E
ANTINOCICEPTIVA DA LECTINA ISOLADA DE SEMENTES
DE *Lonchocarpus sericeus* (POIR.) KUNTH.**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia. Parte desta tese está publicada no *International Immunopharmacol*, v. 7, p. 824-835, 2007 (ver em anexo).

MÁRIO ROGÉRIO LIMA MOTA

M871e

Mota, Mário Rogério Lima

Estudo da atividade anitinflamatória e antinociceptiva da lectina isolada de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (Poir.) Kunth / Mário Rogério Lima Mota; orientador: Nylane Maria Nunes de Alencar. – Fortaleza, 2008.
139f. il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina, 2008.

1. Mediadores da Inflamação 2. Dor 3. Nociceptores 4. Lectinas de Plantas 5. Fabaceae I. Alencar, Nylane Maria Nunes de (Orient.) II. Título

CDD: 615.783

MÁRIO ROGÉRIO LIMA MOTA

**ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DA
LECTINA ISOLADA DE SEMENTES DE *Lonchocarpus sericeus* (Poir.) Kunth.**

**Tese apresentada ao programa de Pós-
Graduação em Farmacologia da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em Farmacologia.**

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Prof. Dra. Cláudia Ferreira Santos
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Prof. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dra. Flávia Almeida Santos
Universidade Federal do Ceará – UFC

*A Deus, minha mãe, Maria das Dores
Lima Mota, a minha orientadora, Nylane Maria
Nunes Alencar e aos meus amigos, Ana Vaneska,
Nilson e Ana Paula, pelo apoio nos momentos
difíceis dessa caminhada.*

Dedico este Trabalho

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre me deu forças para perseverar e continuar, diante de qualquer obstáculo que surgisse.

Aos meus familiares, em especial minha mãe, Maria das Dores Lima Mota que sempre me ensinou a discernir o certo do errado, e se empenhou ao máximo para dar-me escolaridade e educação. Muito obrigado pelo carinho, compreensão, apoio incondicional, educação e incentivo.

À Prof^a Nylane Maria Nunes de Alencar minha atual orientadora, agradeço tudo, principalmente, da maneira amiga que me recebeu e me ensinou. Ela apostou no meu crescimento, e sempre se importou com minha vivência científica, me guiando e alertando para a importância da ciência. Sempre lembrarei dela como exemplo de pesquisadora e professora.

A Prof^a. Ana Maria Sampaio Assreuy, minha orientadora de mestrado, por me ajudar na minha formação científica desde o início, sempre com confiança, compreensão, dedicação, paciência e profissionalismo. Muito obrigado por ter confiado em mim, se não fosse por isso, nada disso teria acontecido.

Ao Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada pela confiança em nos conceder a lectina e ferramentas que foram os objetos imprescindíveis desse trabalho.

Ao Prof Dr. Marcelo Henrique Napimoga por ter realizado parte destes experimentos e por ter me recebido em Uberaba de maneira extremamente amiga, além de ter me ensinado e contribuído para minha formação.

À Prof^a Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves, por ela tenho grande admiração, me acolheu gentilmente no curso de odontologia e me ensinou sempre com muita propriedade e paciência. Muito obrigado por ter confiado em mim e no meu trabalho, por me ensinar tanto e por ter me dado esta oportunidade.

À Prof Dr. Fabrício Bitú, me acolheu no curso de odontologia sempre disposto a me ajudar e ensinar. Agradeço pela grande amizade, com certeza duradoura e de grande valor.

Ao Prof. Marcus Raimundo Vale por contribuir sempre com idéias pertinentes, criativas e construtivas.

Aos amigos Ana Vaneska Passos Meireles, Nilson Vieira Pinto e Ana Paula Passos Meireles, pela ajuda constante em todos os momentos da elaboração deste trabalho, e pela amizade fiel que com certeza seguirá durante todos os anos da minha vida. Vocês estarão para sempre no meu coração não importa o tempo que passe.

Aos meus grandes amigos da pós-graduação Jozi e Flávio sempre tão competentes e dispostos a me ajudar, além de proporcionar um ambiente alegre e descontraído para trabalhar. Eles sempre tiveram grande força de vontade e determinação me ajudando em vários experimentos. Agradeço pela amizade e companherismo e com certeza serão eternos.

À Ingrid que juntamente com o Flávio e a Jozi fizeram parte muito importante desta caminhada, obrigado pela motivação, conselhos e amizade que com certeza levarei comigo.

Aos meus colegas de laboratório: Ítalo, Patrícia, Michael, Priscila, Carla, Cinthia, Cibeles, Elmadan, Ingridzinha e todos os outros que fazem parte desta grande família do laboratório de bioquímica da pós-graduação em farmacologia. Com certeza todos me ajudaram no desenvolvimento desse trabalho e me proporcionaram grandes momentos de aprendizado e companhia.

Aos integrantes do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, principalmente aqueles responsáveis pelo brilhante trabalho árduo, de isolar e purificar a lectina utilizada neste trabalho.

Aos professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, pessoas que sempre se mostraram interessadas em me ensinar e ajudar a desenvolver este trabalho.

Ao Laboratório de Inflamação e Dor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – USP, representado pela pessoa do prof. Dr. Fernando Cunha.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho a minha gratidão.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Muito Obrigado!

**“Quanto maior for a crença em seus objetivos,
mais depressa você os conquistará”**

MAXWELL MALTZ

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 RESPOSTA INFLAMATÓRIA	21
1.1.1 Eventos vasculares	22
1.1.2. Eventos celulares	23
1.1.3. Mediadores inflamatórios	26
1.2 NOCICEPÇÃO E DOR	32
1.2.1. Classificação dos diferentes tipos de dor	33
1.2.2. Fisiopatologia da dor	34
1.2.3. Sistemas modulatórios da dor	36
1.2.4. Dor inflamatória	38
1.2.5 Mediadores com ação nos nociceptores	39
1.3 LECTINAS	41
1.3.1. Lectinas: Definição e Classificação	42
1.3.2. Efeitos biológicos de lectinas vegetais	43
1.3.3. <i>Lonchocarpus sericeus</i>	45
1.4 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	48
2 OBJETIVOS	51
2.1 OBJETIVO GERAL	51
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
2.2.1 Relacionados a atividade antiinflamatória	51
2.2.2 Relacionados a atividade antinociceptiva	51
2.2.3 Relacionados a toxicidade e a investigação de possíveis efeitos centrais	52

3 MATERIAIS E MÉTODOS	54
3.1 LECTINA	54
3.2 DROGAS E REAGENTES	54
3.3 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS	56
3.4 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	57
3.5 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DA LECTINA DE <i>Lonchocarpus sericeus</i> – LSL: EFEITO SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS	58
3.5.1 Avaliação do efeito da lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i> sobre a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina (Cg)	58
3.5.1.1 Efeito da lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i> sobre rolamento e adesão dos leucócitos induzidos por Cg na microcirculação mesentérica (modelo de microscopia intravital)	59
3.5.1.2 Efeito da lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i> sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas na cavidade peritoneal estimulada com Cg	60
3.5.1.3 Envolvimento do óxido nítrico no efeito antiinflamatório da lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i>	61
3.5.1.3.1 Dosagem do óxido nítrico (NO) no soro dos animais pré-tratados e.v. com lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i>	61
3.5.1.3.2 Efeito de Inibidores da Síntese de NO sobre a Inibição da migração de neutrófilos pela lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i>	62
3.5.2 Avaliação do efeito da lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i> sobre a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por Ovalbumina (OVA) em animais pré-imunizados	62
3.5.2.1 Elisa para IgG (imunoglobulina G) anti-OVA	63
3.5.3 Efeito da lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i> sobre a quimiotaxia in vitro de neutrófilos	64
3.6 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA LECTINA DE <i>Lonchocarpus sericeus</i> – LSL	65
3.6.1 Modelo de nocicepção induzida por ácido acético: contorções abdominais	65
3.6.2 Modelo de nocicepção induzida por formalina	65
3.6.3 Modelo de nocicepção induzida por elevação da temperatura: Teste da Placa quente	66
3.6.4 Modelo de hipernocicepção mecânica induzida por carragenina e prostaglandina E₂ (PGE₂)	66

3.6.4.1	Efeito da lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i> sobre a migração de neutrófilos na hipernocicepção induzida por carragenina	67
3.6.4.2	Efeito da lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i> sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas na hipernocicepção induzida por carragenina	68
3.6.5	Modelo de hipernocicepção mecânica induzida por OVA em animais pré-imunizados	68
3.7	AVALIAÇÃO DE AÇÕES DA LECTINA DE <i>Lonchocarpus sericeus</i> SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL: MODELOS DE COMPORTAMENTO ANIMAL	69
3.7.1	Avaliação da atividade motora	69
3.7.1.1	Teste do rota rod	69
3.7.1.2	Teste do campo aberto	69
3.7.2	Avaliação da atividade depressora: Teste do nado forçado	70
3.8	TOXICIDADE AGUDA	70
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	71
4	RESULTADOS	73
4.1	ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA	73
4.1.1	Lectina de <i>Lonchocarpus sericeus</i> reduz a migração de neutrófilos induzida por carragenina em camundongos	73
4.1.2	Lectina de <i>Lonchocarpus sericeus</i> inibe o rolamento e a adesão dos leucócitos no endotélio vascular de animais estimulados com carragenina.	73
4.1.3	Lectina de <i>Lonchocarpus sericeus</i> reduz os níveis de citocinas (TNF-α e IL-1β) no exsudato peritoneal de camundongos estimulados com carragenina.	76
4.1.4	Lectina de <i>Lonchocarpus sericeus</i> reduz os níveis de quimiocinas (MIP-1, KC) no exsudato peritoneal de camundongos estimulados com carragenina	76
4.1.5	O tratamento e.v. com a lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i> induz aumento nos níveis sanguíneos de óxido nítrico (NO)	79
4.1.6	Inibidor específico da iNOS inibe a atividade antiinflamatória da lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i> na peritonite induzida por carragenina	79
4.1.7	Lectina de <i>Lonchocarpus sericeus</i> reduz a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por OVA em camundongos imunizados.	81

4.1.8	Lectina de <i>Lonchocarpus sericeus</i> não interfere na quimiotaxia induzida por MIP-2 in vitro	81
4.2	ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIINOCICEPTIVA	84
4.2.1	Lectina de <i>Lonchocarpus sericeus</i> reduz a frequência de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.	84
4.2.2	Lectina de <i>Lonchocarpus sericeus</i> apresenta atividade antinociceptiva somente na fase inflamatória do teste da formalina	84
4.2.3	Lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i> não interfere no tempo de reação dos camundongos no modelo da placa quente	86
4.2.4	Lectina de <i>Lonchocarpus sericeus</i> reduz a hipernocicepção mecânica induzida por carragenina em camundongos, mas não por Prostaglandina E ₂ (PGE ₂)	88
4.2.5	Lectina de <i>Lonchocarpus sericeus</i> reduz a migração de neutrófilos induzida por carragenina na pata de camundongos	88
4.2.6	Lectina de <i>Lonchocarpus sericeus</i> reduz os níveis de TNF- α e IL-1 β nas patas de camundongos estimulados com carragenina	91
4.2.7	Lectina de <i>Lonchocarpus sericeus</i> reduz os níveis MIP-1 e KC nas patas de camundongos estimulados com carragenina.	91
4.2.8	Lectina de <i>Lonchocarpus sericeus</i> reduz a hiperalgesia mecânica induzida por OVA em camundongos imunizados.	94
4.3	ESTUDO DA ATIVIDADE DA <i>Lonchocarpus sericeus</i> SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL	96
4.3.1	Lectina de <i>Lonchocarpus sericeus</i> não modificou a coordenação motora de camundongos no teste de rota rod.	96
4.3.2	Lectina de <i>Lonchocarpus sericeus</i> não modificou a locomoção espontânea de camundongos no teste de campo aberto.	96
4.3.3	Lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i> não alterou o tempo de imobilização dos camundongos no teste de nado forçado.	97
4.4	EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO COM LECTINA DE SEMENTES DE <i>Lonchocarpus sericeus</i> EM CAMUNDONGOS.	100
5	DISCUSSÃO	103
6	CONCLUSÃO	116
7	REFERÊNCIAS	118
	ANEXO – Artigo publicado (International Immunopharmacol, v. 7, p. 824-835, 2007)	141

LISTA DE SIGLAS

AAS =	Ácido acetilsalicílico
ALT =	Alanina aminotransferase
AMPA =	Ácido alfa-amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazoil propiônico
AMPc =	Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA =	Análise de Variância
AST =	Aspartato aminotransferase
ATP =	Adenosina trifosfato
BioMoLab =	Laboratório de Moléculas biologicamente ativas
BK =	Bradicinina
BSA =	Albumina sérica bovina
Ca ⁺⁺ =	Íon cálcio
CFA =	Adjuvante de freund's completo
CGPR =	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CPA =	Substância cinzenta periaquedutal
E.P.M. =	Erro padrão da média
ELISA =	Ensaio imunoabsorbante por enzima ligada "enzyme-linked immunosorbent assay"
ENA-78 =	Peptídeo ativador de neutrófilos derivado de células epiteliais
e.v. =	Endovenoso
FMN =	Flavina adenina mononucleotídeo
GABA =	Ácido gama-aminobutírico
GMPc =	Guanosina monofosfato cíclico
HE =	Hematoxilina Eosina
FI =	Falso imunizado
IASP =	Associação internacional para estudo da dor
ICAM	Moléculas de adesão intercelular-1 e 2 (do inglês: Intercellular Adhesion Molecule)
IFN- α =	Interferon alfa
IFN- γ =	Interferon gama
IGg =	Imunoglobulina G
IL-1 =	Interleucina 1
IL-2 =	Interleucina 2
IL-3 =	Interleucina 3
IL-4 =	Interleucina 4

IL-5 =	Interleucina 5
IL-6 =	Interleucina 6
IL-8 =	Interleucina 8
IL-10 =	Interleucina 10
IL-13 =	Interleucina 13
i.p. =	Intraperitoneal
i.v. =	Intravascular
L. sericeus	<i>Lonchocarpus sericeus</i>
LSL =	Lectina de <i>Lonchocarpus sericeus</i>
L-NAME =	L-nitroarginina metil éster
mAb =	Anticorpo monoclonal
MCP-1 =	Proteína quimiotática para monócitos um
MCP-2 =	Proteína quimiotática para monócitos dois
MCP-3 =	Proteína quimiotática para monócitos três
MCP-4 =	Proteína quimiotática para monócitos quatro
Morf. =	Morfina
MPO =	Mieloperoxidase
NaCl =	Cloreto de sódio
NaPO ₄ =	Fosfato de sódio
NAD =	Niconinamida adenina dinucleotídeo
NADPH =	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
Nalox. =	Naloxona
NAP-2 =	Peptídeo ativador de neutrófilos dois
NFK β =	Fator de transcrição nuclear kappa beta
NGF =	Fator de crescimento do nervo
NK =	Matadores naturais “natural killers”
NMDA =	N-metil-D-aspartato
NO =	Óxido nítrico
NOS =	Óxido nítrico sintase
NOS _i =	Óxido nítrico sintase induzida
NOS _n =	Óxido nítrico sintase neuronal
NOS _e =	Óxido nítrico sintase endotelial
NO ₂ - =	Nitrito
NO ₃ - =	Nitrato
OVA =	Ovalbumina

PAF	Fator de agregação plaquetária
PBS =	Tampão salina fosfato
PCAM	Molécula de adesão de célula endotelial e plaqueta
PG =	Prostagandina
PGE ₂ =	Prostaglandina E ₂
PF-4 =	Fator plaquetário quatro
PKC =	Proteína quinase C
s.c. =	Subcutâneo
SNC =	Sistema nervoso central
SP =	Substância P
TGF- β =	Fator de crescimento transformador beta
THB4 =	Tetrahidrobiopterina
TNF- α =	Fator de necrose tumoral alfa
VCAM	Molécula de adesão vascular (do inglês: vascular adhesion molecule)

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Foto de um espécimen de <i>Lonchocarpus sericeus</i> (a). Destaque para frutos (b) e inflorescências (c).	45
Figura 2	Lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i> (LSL) inibe a migração neutrofílica (MN) induzida por carragenina (Cg) para a cavidade peritoneal de camundongos.	74
Figura 3	Lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i> (LSL) diminui a adesão e o rolamento de leucócitos nas células endoteliais	75
Figura 4	Lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i> (LSL) reduz os níveis de citocinas (TNF- α e IL-1 β) no exudato peritoneal em camundongos estimulados com carragenina.	77
Figura 5	Lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i> (LSL) reduz os níveis de quimiocinas (MIP-1 e KC)) no exsudato peritoneal em camundongos estimulados com carragenina.	78
Figura 6	Lectina de <i>Lonchocarpus sericeus</i> (LSL) induz aumento de NO no sangue de camundongos.	80
Figura 7	Aminoguanidina diminuiu efeito antiinflamatório da lectina de <i>lonchocarpus sericeus</i> (LSL) no modelo de peritonite induzida por Cg.	80
Figura 8	Lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i> (LSL) reduz migração de neutrófilos (MN) induzida por ovoalbumina (OVA) em camundongos imunizados.	82
Figura 9	Lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i> não inibe quimiotaxia de neutrófilos induzida por MIP-2 <i>in vitro</i> .	83
Figura 10	Lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i> (LSL) reduz o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.	85
Figura 11	Lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i> (LSL) inibe a segunda fase do teste de formalina em camundongos.	85
Figura 12	Lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i> (LSL) não apresenta efeito no teste da placa quente em camundongos.	87
Figura 13	Lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i> (LSL) reduz hipernocicepção mecânica induzida por carragenina, mas não por PGE.	89
Figura 14	Lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i> (LSL) reduz o influxo de neutrófilos na pata de camundongos estimulados com carragenina.	90
Figura 15	Lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i> (LSL) reduz os níveis de citocinas (TNF- α e IL-1 β) na pata de camundongos estimulados com carragenina.	92

Figura 16	Lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i> (LSL) reduz os níveis de MIP-1 e KC na pata de camundongos estimulados com carragenina.	93
Figura 17	Lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i> (LSL) reduz a hipernocicepção induzida por ovoalbumina (OVA).	95
Figura 18	A coordenação motora de camundongos não é afetada pela administração de lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i> (LSL)	98
Figura 19	A locomoção espontânea de camundongos não é afetada com a administração de lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i> (LSL).	98
Figura 20	Lectina de sementes de <i>Lonchocarpus sericeus</i> (LSL) não provoca depressão em camundongos.	99
Figura 21	Representação esquemática da hipótese do efeito antiinflamatório da lectina de <i>Lonchocarpus sericeus</i> .	107
Figura 22	Representação esquemática da hipótese do efeito antinociceptivo da lectina de <i>Lonchocarpus sericeus</i> .	112
Tabela 1	Tratamento agudo de camundongos com <i>Lonchocarpus sericeus</i> não induz toxicidade sistêmica	101

RESUMO

ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DA LECTINA ISOLADA DE SEMENTES DE *Lonchocarpus sericeus* (Poir.) Kunth. Mário Rogério Lima Mota. Orientadora: Prof^a. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará (UFC), 2008.

Lectinas são (glico)proteínas de origem não imune e que podem reconhecer e se ligar reversivelmente a carboidratos ou a outras substâncias derivadas de açúcares. A lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (LSL) apresenta massa molecular aparente de 23555 ± 15 Da e especificidade de ligação a N-acetil-glicosamina e α -metil-glicopiranosídeo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiinflamatória e antinociceptiva da Lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (LSL). Para tal, utilizamos camundongos Swiss albinos (25-35g). No estudo da atividade antiinflamatória, LSL (3 ou 10 mg/kg; e.v.; 15 minutos) inibiu a migração (rolamento e adesão de neutrófilos) para a cavidade abdominal de animais estimulados com carragenina (Cg), e este efeito parece estar relacionado com a redução dos níveis de citocinas (TNF- α and IL-1 β) e quimiocinas (MIP-1 α [CCL3], KC [CXCL1]) por esta lectina. O efeito inibitório da LSL sobre a migração de neutrófilos, parece também envolver o aumento nos níveis sistêmicos de óxido nítrico (NO), pois LSL (10 mg/kg; e.v.) foi capaz de aumentar os níveis de NO no soro de animais, e o pré-tratamento de camundongos com aminoguanidina (inibidor da óxido nítrico sintase induzida) foi capaz de reverter o efeito antiinflamatório desta lectina sobre a migração de neutrófilos. Ainda em relação à atividade antiinflamatória, LSL foi capaz de inibir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais imunizados e estimulados com ovalbumina (OVA), porém, esta mesma lectina foi ineficaz em inibir a migração de neutrófilos *in vitro* estimulada por MIP-2, demonstrando então um papel indireto da LSL (redução de citocinas e quimiocinas) na inibição da migração. No estudo da atividade antinociceptiva, LSL (10 ou 100 mg/kg; e.v.; 15 minutos) reduziu as contorções abdominais induzidas por ácido acético e diminuiu somente a segunda fase do teste da formalina, demonstrando uma atividade sobre a dor inflamatória. No teste da placa quente, LSL não apresentou efeito. Para avaliar a dor inflamatória realizaram-se estudos de atividade antihipernociceptiva. Assim, LSL (3 ou 10 mg/kg; e.v.; 15 minutos) inibiu a hipernocicepção mecânica induzida por administração intraplantar de carragenina e ovalbumina (animais imunizados) mas não a induzida por prostaglandina E₂ (PGE₂). Este efeito foi correlacionado ao bloqueio do influxo de neutrófilos, sugerido pela redução dos níveis de mieloperoxidase (MPO) nas patas de animais pré-tratados com LSL (3 ou 10 mg/kg; e.v.; 15 minutos) e estimulados com carragenina. Este efeito antihiperalgésico parece também depender da redução dos níveis de citocinas (TNF- α and IL-1 β) e quimiocinas (MIP-1 α [CCL3], KC [CXCL1]), uma vez que LSL (3 ou 10 mg/kg; e.v.; 15 minutos) reduziu os níveis destes mediadores no tecido da pata de animais estimulados com Cg (intraplantar). Em relação a uma possível atividade central, LSL (10 mg/kg; e.v.) não alterou a atividade motora e nem provocou depressão nos animais. A toxicidade aguda foi avaliada pelo tratamento de camundongos com LSL (10 mg/kg; e.v.), durante sete dias consecutivos, através de vários parâmetros: funções do rim (peso úmido, dosagem de uréia) e do fígado (peso úmido, avaliação da cinética da aspartato amino transaminase e alanina amino transaminase), coração (peso úmido), estômago (peso úmido e avaliação visual de possíveis lesões), variação de massa corporal dos animais tratados e leucograma. Os resultados obtidos não mostraram qualquer alteração dos parâmetros avaliados, demonstrando que a LSL não apresenta nenhuma toxicidade nos animais. Em conclusão, a atividade antiinflamatória e antinociceptiva da LSL está associada com a inibição da migração de neutrófilos, que provavelmente é reflexo da inibição da liberação de citocinas e quimiocinas e do aumento na liberação de NO. Adicionalmente, esta lectina não apresenta efeitos centrais nem toxicidade aguda.

ABSTRACT

STUDY OF ANTIINFLAMMATORY AND ANTINOCICEPTIVE ACTIVITIES OF LECTIN FROM *Lonchocarpus sericeus* SEEDS (POIR.) KUNTH. Mário Rogério Lima Mota. Supervisor: Prof^a. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar. Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceara (UFC), 2008.

Lectins are non-immune (glyco)proteins that can recognize and reversibly bind to carbohydrates or other substances derived from sugars. *Lonchocarpus sericeus* seeds (LSL) shows a molecular mass of 23555 ± 15 Da and a α -methyl glucopyranoside and N-acetylglucosamine binding specificity. The aim of this work was to evaluate the antinociceptive and antiinflammatory activity of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds (LSL). To do so, we used swiss mice (25-35g). In the antiinflammatory activity studying, LSL (10 or 100 mg/kg; i.v.; 15 minutes) inhibited the migration (neutrophil rolling and adhesion) to the peritoneal cavities of animals stimulated with carrageenan (Cg), and the effect seems to be related to the cytokines (TNF- α and IL-1 β) and chemokines (MIP-1 α [CCL3], KC [CXCL1]) level reduction induced by this lectin. The LSL inhibitory effect on the neutrophil migration seems to be also related to the nitric oxide (NO) systemic levels increasing. LSL was effective on the NO increasing on animals' serum. The pretreatment of mice using aminoguanidin (nitric oxide reduced synthase inhibitor) reversed the antiinflammatory effect of lectin on the neutrophil migration. Still referring to the anti-inflammatory activity, LSL was effective on inhibiting the neutrophil migration to the peritoneal cavities of animals immunized and stimulated with ovalbumin (OVA), but the lectin was unable to inhibit an *in vitro* neutrophil migration induced by MIP-2, showing an indirect action of LSL (cytokines and chemokines) on the migration inhibition. In the antinociceptive study, LSL (3 or 10 mg/kg; i.v.; 30 minutes) reduced abdominal contortion induced by acetic acid and only decreased the second phase of formalin test, showing an activity on the inflammatory pain. In the hot plate test LSL didn't show any effects. To evaluate the anti-inflammatory pain, we did a study based on the antihypernociceptive activity. Thus, LSL (10 or 100 mg/kg; i.v.; 15 minutes) inhibited the mechanical hypernociception induced by carrageenan and ovalbumin (immunized animals) intraplantarly administration, but not induced by prostaglandin E₂ (PGE₂). This effect was correlated to the block of neutrophil influx, suggested by the reduction of myeloperoxidase (MPO) levels on animal's paws pretreated with LSL (3 or 10 mg/kg; i.v.; 15 minutes) and stimulated with carrageenan. This antihyperalgesic effect seems to be highly dependent of the cytokines (TNF- α and IL-1 β) and chemokines (MIP-1 α [CCL3], KC [CXCL1]) level decreasing, since LSL (10 or 100 mg/kg; i.v.; 15 minutes) reduced these mediators' levels on animal's paws pretreated with Cg (intraplantar). Corresponding to the possible central activity, LSL (10 mg/kg; i.v.) did not alter the motor activity and not provoked depression on animals. LSL acute toxicity was evaluated by treating the rats with LSL (10 mg/kg; i.v.) during seven days analyzing several parameters of the animals: kidney functions (wet weight, urea dosage), liver functions (wet weight, kinetic evaluation of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase), heart (wet weight) stomach (wet weight and visual evaluation of possible lesions), variation in body weight of treated animals and leukogram. The obtained results didn't show any alteration on the evaluated parameters suggesting that LSL doesn't show any toxicity on animals. In conclusion, the antinociceptive and antihyperalgesic activity of LSL are associated to the inhibition of the neutrophil migration; it is probably a reflection of an inhibition on cytokines and chemokines free flowing and for the increasing of NO free flow. Additionally, this lectin doesn't show acute toxicity and central effects.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 RESPOSTA INFLAMATÓRIA

O termo inflamação ou flogose (do latim, inflamare e do grego phlogos, que significa pegar fogo) retratam como os povos mais primitivos comparavam uma região inflamada com algo relativo a chamas, quente ou ardido. Historicamente, as quatro manifestações clínicas da inflamação (rubor, dor, calor e tumor) foram descobertas por Cronelius Celsus no início da era cristã e o grego Virchow adicionou o quinto sinal: a perda da função. Segundo Vilcek e Feldman (2004) a inflamação é um conjunto de alterações (nos vasos sanguíneos, nos tecidos e nos fluidos internos) provocadas por lesões, infecções, substâncias nocivas ou distúrbios orgânicos e está estreitamente interligada ao processo de reparação.

Assim, a reação inflamatória consiste num evento complexo que envolve o reconhecimento do agente/estímulo lesivo, para sua posterior destruição e tentativa de reconstruir o tecido danificado. O reconhecimento desencadeia a ativação e a amplificação do sistema imune resultando na ativação de células e na liberação de diversos mediadores responsáveis pela resposta inflamatória. No entanto, se a destruição do agente agressor e o processo de reparo não ocorrem de maneira eficiente e sincronizada, a resposta inflamatória pode levar a uma lesão tecidual persistente induzida pelo acúmulo de leucócitos, colágeno entre outras substâncias que podem ser prejudiciais ao organismo (NATHAN, 2002).

O processo inflamatório é didaticamente dividido em dois momentos. O primeiro que é desencadeado logo após a instalação do agente agressor (inflamação aguda), sendo caracterizado por infiltrado predominantemente neutrofílico, associado ao aumento de permeabilidade vascular com exsudação de plasma e proteínas plasmáticas, edema, dor e necrose. O outro momento que depende ou não da resolução do processo na fase aguda (inflamação crônica), é caracterizado pela presença de macrófagos e linfócitos, além de angiogênese e proliferação de tecido conjuntivo (BAUHMANN; GAUDIE, 1994).

O processo inflamatório compreende dois eventos que ocorrem simultaneamente durante o curso evolutivo desta reação (eventos vasculares e celulares).

1.1.1 Eventos vasculares

Microscopicamente a inflamação envolve uma série de eventos complexos nos qual a mudança vascular é a que se inicia rapidamente e desenvolve-se durante as primeiras horas. Mudanças vasculares são reguladas por fatores que controlam a exsudação, as quais ocorrem principalmente nas vênulas pós-capilares. Esta fase ocorre ou concomitantemente é desenvolvida em associação entre neutrófilos e o endotélio nas vênulas pós-capilares, a qual contribui para uma fase mais prolongada de aumento da permeabilidade vascular. O exsudato é absorvido para dentro dos vasos linfáticos, aonde deslocam-se para os nódulos linfáticos ou tecido linfático onde uma reação imune pode então ser iniciada (CIRINO *et al.*; 2003).

Inicialmente, ocorre 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 advinda do aumento de permeabilidade da microvasculatura, uma vez que o extravasamento de líquidos e proteínas para o interstício provoca hemoconcentração, aumentando a viscosidade sanguínea e gerando o alentecimento da circulação. Esses eventos são desencadeados por vários mediadores químicos, incluindo-se a bradicinina, a serotonina, a histamina e as prostaglandinas da série E e da série I e óxido nítrico (NO). Já foi demonstrado que o óxido nítrico (NO) é um dos EDRFs liberados pelas células endoteliais (PALMER *et al.*, 1988; MONCADA *et al.*, 1991), que participa do controle do fluxo sangüíneo (FORTES *et al.*, 1994), da expressão de moléculas de adesão e do aumento da permeabilidade vascular induzida pelo fator ativador de plaquetas (PAF) e pela própria bradicinina (MAYHAN, 1992).

O aumento da permeabilidade vascular pode ocorrer por diferentes mecanismos, dependendo dos receptores ativados na célula endotelial ou da lesão provocada no vaso sanguíneo. Propõe-se que a histamina e leucotrienos causam contração endotelial; interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) participam da reorganização citoesquelética endotelial; leucócitos ou agentes agressores provocam lesão vascular direta e extravasamento de fluidos; fator de crescimento endotelial vascular gera aumento da transcitose e neovascularização, que também provoca extravasamento de fluidos. O exsudato contém vários mediadores que influenciam as células adjacentes e os próprios vasos sanguíneos e

incluem os componentes de quatro cascatas enzimáticas do plasma: sistema do complemento, sistema da coagulação, sistema fibrinolítico e sistema das cininas (ROBBINS *et al.*, 2005).

1.1.2 Eventos celulares

Uma maneira eficiente do hospedeiro defender-se contra agentes agressores é através do infiltrado leucocitário, onde as células imunológicas alcançam o foco da lesão e fagocitam, degradam e matam antígenos estranhos. Muitas vezes, num processo inflamatório prolongado estas células imunes podem agredir os próprios tecidos do hospedeiro, lesionando células normais. Além do que o próprio infiltrado celular pode contribuir para a amplificação dos eventos vasculares e celulares da resposta inflamatória, através da liberação de mediadores vasoativos e quimiotáticos (BEVILACQUA *et al.*, 1994; WEDMORE; WILLIAMS, 1981).

Diversas são as células envolvidas no processo inflamatório, algumas células já estão presentes no tecido afetado, tais como: células endoteliais, mastócitos e células mononucleares residentes. Enquanto outras como os leucócitos polimorfonucleares (PMN) (neutrófilos, basófilos e eosinófilos) e mononucleares (monócitos e linfócitos) migram para o local da lesão. Os leucócitos são atraídos para a região afetada por um processo conhecido como quimiotaxia. Os macrófagos residentes participam de vários eventos da inflamação são responsáveis pela fagocitose do agente agressor, pela liberação de vários mediadores desencadeando outros eventos inflamatórios como edema e dor (FERREIRA, 1980). Eles atuam na iniciação da mobilização de neutrófilos em direção ao local agredido.

De um modo geral, a migração de leucócitos ocorre nas seguintes etapas: 1. marginação; 2. rolamento (adesão fraca); 3. adesão firme; 4. diapedese e 5. quimiotaxia.

Após a quebra do fluxo laminar sanguíneo provocado pelos eventos vasculares, os leucócitos começam a migrar para a região vascular periférica, fenômeno chamado de marginação. Posteriormente, essas células interagem com

moléculas de adesão (selectinas, integrinas e imunoglobulinas), que são extremamente importantes na modulação da migração, pois possibilitam uma adesão do leucócito ao endotélio (McEVER, 1991).

As selectinas têm sido extensivamente estudadas, são lectinas que interagem com açúcares e/ou glicoproteínas, são responsáveis pela adesão de leucócitos ao endotélio vascular na cascata precoce de eventos que levam aos processos de inflamação. Elas são necessárias para a migração de leucócitos, sendo o passo inicial na sequência dos eventos que resultará no extravasamento dos neutrófilos nos sítios de injúria. A interação das selectinas com seus ligantes resulta num declínio dramático da velocidade dos neutrófilos, o que permite que as proteínas conhecidas como integrinas promovam ligamentos firmes dos neutrófilos com o endotélio. O processo de adesão do leucócito vascular se dá através dessas proteínas. As moléculas de adesão conferem à célula um “endereçamento”. Elas podem ancorar células em tecidos específicos ou “endereçar” células migrantes a determinadas regiões do corpo. Estruturalmente, as selectinas apresentam, um domínio lectínico (responsável pela sua propriedade adesiva) e uma série de domínios semelhantes às proteínas do complemento (CRONSTEIN; WEISSMAN, 1993; ROSSITER *et al.*, 1997).

Embora as lectinas endógenas (selectinas) estejam envolvidas no processo de adesão, elas não são as únicas a participarem deste, pois outras moléculas como as imunoglobulinas e as integrinas também contribuem para o mesmo. No entanto, demonstrou-se que as selectinas estão principalmente envolvidas com a fase de rolamento dos leucócitos (PANÉS *et al.*, 1999).

Os três tipos de selectinas conhecidos foram denominados de acordo com o tecido no qual eles foram identificados:

- As L-selectinas são encontradas nos leucócitos e são responsáveis pelo endereçamento (i.e., *homing*) durante a interação com ligantes endoteliais (KANSAS, 1996);
- As E-selectinas aparecem nas células endoteliais após terem sido ativadas por citocinas inflamatórias, sendo que uma pequena quantidade encontrada em vários leitos vasculares parecem ter significado importante para a migração dos leucócitos (KANSAS, 1996) ;

As P-selectinas são armazenadas em alfa-grânulos das plaquetas e corpos de Weibel-Palade (i.e., vesículas intracitoplasmáticas) das células endoteliais, e são prontamente posicionadas na membrana plasmática após uma estimulação específica (KANSAS, 1996).

Conforme já mencionado, o tipo de leucócito que migra varia com o estímulo e com a fase do processo inflamatório (GRANGER; KUBES, 1994). Por exemplo, na inflamação aguda, os neutrófilos polimorfonucleares predominam no infiltrado leucocitário durante as primeiras 6-12 horas, sendo substituídos por mononucleares entre 24 e 48 horas. Esta seqüência pode ser explicada pela ativação de diferentes moléculas de adesão e fatores quimiotáticos específicos para cada tipo celular.

À medida que o leucócito rola, as L-selectinas se despreendem e suas integrinas são ativadas por pelo menos uma variedade de quimiocinas e citocinas quimiotáticas associadas à superfície endotelial.

Após o rolamento, segue-se a adesão firme mediada por imunoglobulinas e β -2 integrinas. Essas últimas são proteínas presentes na membrana dos leucócitos e que podem ter sua expressão aumentada após a ativação destas células por mediadores inflamatórios como o PAF ou outras citocinas. As ICAMs (imunoglobulinas de adesão) são moléculas que estão presentes no endotélio, sendo que as mais ligadas ao processo de migração são: ICAM-1 (Moléculas de adesão intercelular-1), ICAM-2 (Moléculas de adesão intercelular-2), VCAM-1 (molécula de adesão vascular) e PCAM-1 (molécula de adesão de célula endotelial e plaqueta). Mediadores inflamatórios liberados por células residentes ativadas podem agir aumentando a avidéz de ligação entre as moléculas de integrinas e imunoglobulinas, favorecendo a adesão firme (CRONSTEIN; WEISSMAN, 1993; PANÉS, 1999).

Após a firme fixação ocorre o achatamento da célula, reduzindo a exposição às forças decorrentes do fluxo sangüíneo vascular, aumentando-se desta forma a área de contato com a superfície endotelial vascular. Finalmente o leucócito migra entre as células endoteliais da região apical para a superfície basolateral (diapedese) em direção ao extravascular. Assim, após o extravasamento, os leucócitos emigram nos tecidos em direção à região de agressão por um processo

denominado de quimiotaxia ou locomoção através de um gradiente químico. Esse processo é controlado por agentes quimiotáticos, tanto de origem endógena, que são aqueles liberados pelas próprias células do hospedeiro (componentes do sistema complemento, produtos da lipoxigenase, citocinas etc.), quanto de origem exógena, que são aqueles advindos do próprio agente agressor (produtos bacterianos de origem lipídica) (RIBEIRO *et al.*, 1991; 1996).

1.1.3 Mediadores inflamatórios

Os mediadores inflamatórios atuam nos vasos sanguíneos e células inflamatórias modulando os principais eventos relacionados a inflamação: vasodilatação, opsonização, quimiotaxia para células inflamatórias, destruição tecidual e dor, como também febre e mal estar. Os mediadores da inflamação são classificados como de origem plasmática (advindo das cascatas das cininas, coagulação, fibrinólise e complemento) ou tecidual (aminas vasoativas, eicosanóides, enzimas lisossomais, radicais livres derivados do oxigênio, fator ativador de plaquetas, citocinas, quimiocinas, óxido nítrico e fatores de crescimento). (LANSEN; HENSON, 1993; SIQUEIRA; DANTAS, 2000).

A histamina e a serotonina estão envolvidas na vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular no local da inflamação. A liberação de histamina pelos mastócitos e basófilos é desencadeada por injúria tecidual, complexo antígeno-anticorpo e pelo sistema do complemento (YOKOYAMA *et al.*; 1989). Segundo Yokoyama e seus colaboradores (1989), o Sistema de cininas tem como função a ativação das plaquetas e produção de bradicinina e calicreína. A bradicinina um potente agente vasoativo, produz vasodilatação, causando dilatação induzindo a liberação de fatores de óxido nítrico (NO), contração da musculatura lisa e produção de dor. A Calicreína um agente quimiotático para neutrófilos. O Sistema do complemento participa da resposta imune adaptativa, porém pode ser ativado por uma via alternativa a partir de endotoxinas (lipossacarídeos de parede bacteriana) e por outros sistemas de enzimas plasmáticas (cascata das calicreínas, cascata da coagulação e cascata da fibrinólise). Tem função de opsonização de microorganismos e promove a degranulação de mastócitos e age como fator quimiotático de fagócitos.

As prostaglandinas originadas da conversão do ácido araquidônico também agem como importantes substâncias vasodilatadoras. A liberação do ácido araquidônico ocorre como consequência da estimulação específica de receptores da superfície celular e da subsequente ativação de fosfolipases do tipo A_2 . Vários tipos de células liberam ácido araquidônico em resposta a diferentes estímulos tais como bradicinina, angiotensina II, vasopressina, trombina, colágeno, adrenalina, ADP, peptídios quimiotáticos e histamina (CARVALHO *et al.*, 1996).

Duas grandes rotas do metabolismo em células de mamíferos correspondem a via da ciclooxigenase e a via da lipoxigenase. A fosfolipase A_2 induz liberação de ácido araquidônico, o qual pode ser substrato da ciclooxigenase (responsável pela produção de prostanóides incluindo prostaglandinas e tromboxano A_2), e da 5-lipoxigenase (responsável pela produção de leucotrienos) (YOSHIKAI, 2001).

A via da ciclooxigenase conduz a geração de prostaglandinas que incluem PGE_2 , PGD_2 , $PGF_{2\alpha}$, PGI_2 (prostaciclina) e tromboxano (TXA_2), todos derivados da ação de enzimas específicas (ROBBINS *et al.*, 2005).

As prostaglandinas podem participar de reações alérgicas. Efeito biológico de prostaglandinas produzido durante a reação de mastócitos em tecidos incluem a modulação da musculatura lisa e contração, permeabilidade vascular, sensação de prurido e dor e agregação plaquetária (WHITE, 1999).

Na via da lipoxigenase a 5-lipoxigenase é a enzima predominante dos neutrófilos. O produto principal, a HETE, que é quimiotática para neutrófilos é convertida em uma série de compostos conhecidos como leucotrienos. Dentre os leucotrienos mais importantes está o LTB_4 , que causa aderência de neutrófilos ao endotélio das vênulas pós-capilares, sendo também um potente agente quimiotático para neutrófilos. O LTC_4 , LTD_4 e LTE_4 causam vasoconstrição, broncoespasmo e aumento da permeabilidade vascular (SIQUEIRA; DANTAS, 2000).

Outra classe de mediador, as citocinas, são importantes substâncias produtoras não só de inflamação, mas de uma grande variedade de efeitos biológicos. Citocinas atuam através de mecanismos autócrinos e parácrinos, na célula-alvo, ligam-se a receptores específicos e de alta afinidade, ativando-os; na maioria dos casos, são supra-regulados na célula quando são estimulados. A

maioria das citocinas exerce ação em receptores ligados à quinase, que regulam cascatas de fosforilação afetando assim sua expressão gênica (PHILIP *et al.*, 2004).

As citocinas são classificadas em subgrupos, como: interleucinas, fatores de crescimento, quimiocinas, interferons e fatores estimuladores de colônia ou ainda podem ser classificadas conforme sua atividade biológica como, por exemplo: pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF α e TGF β) e antiinflamatórias (IL-1Ra, IL-4 e IL-10) (CAVAILLON, 2001).

Segundo Robins *et al.* (2005), além de ações diretas sobre as células, algumas citocinas induzem a formação de outras citocinas (formando uma cascata de amplificação), enquanto algumas induzem a expressão dos receptores de outras citocinas e também podendo apresentar interações sinérgicas ou antagônicas com outras citocinas. A IL-6, por exemplo, é uma citocina multifatorial secretada por todas as células quando lesadas ou ativadas por IL-1 e/ou TNF- α . De outro modo, citocinas como a IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 e IFN- α são eficientes em inibir *in vitro* a síntese de IL-1 e TNF- α . As citocinas incluem peptídeos tanto pró-inflamatórios e algogênicos, quanto antiinflamatórios e analgésicos.

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que apresenta papel chave em diversos processos, como a inflamação, imuno-modulação, crescimento, angiogênese, citotoxicidade e dor. Está bem descrito na literatura, a participação do TNF- α no recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório. Embora, o TNF- α não seja considerado um fator quimiotático clássico, uma vez que não induz migração de neutrófilos *in vitro*, este promove a síntese e liberação de fatores quimiotáticos, como as quimiocinas, tanto pelas células endoteliais quanto pelas células residentes, além de participar da expressão de moléculas de adesão, endoteliais e da interação entre estas moléculas (selectinas, integrinas e imunoglobulinas) (FACCIOLI *et al.*, 1990).

Outra citocina importante na inflamação é a IL-1, com funções semelhantes ao TNF- α , participando como mediador da resposta inflamatória do hospedeiro frente a infecções e outros estímulos inflamatórios. A IL-1 possui duas formas chamadas de IL-1 α e IL-1 β , com 30% de homologia entre elas, compartilhando os mesmos receptores e ações biológicas. Em baixas concentrações a IL-1 (ambas) age como um mediador local da inflamação, aumentando a

expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais. Em altas concentrações a IL-1 (ambas) chega ao sistema circulatório e passa a exercer efeitos endócrinos como febre e indução da síntese de proteínas plasmáticas de fase aguda pelo fígado (FACCIOLI *et al.*, 1990).

As quimiocinas são um grande grupo de proteínas (citocinas) que atuam induzindo quimioatração de diversos tipos celulares (leucócitos, fibroblastos, células neoplásicas, células pluripotentes sanguíneas). Até o momento já foram descritas mais de 50 quimiocinas e 18 receptores para as mesmas, estas moléculas pertencem a uma família de proteínas homólogas (60 a 80 aminoácidos) com pesos moleculares variando de 7 a 15Kda (KAPP *et al.*, 1994; ELSNER *et al.*, 1996).

Os genes que codificam estas proteínas se encontram nos cromossomos humanos 4 e 17. As quimiocinas são divididas em quatro sub-grupos, baseado no número e posição dos resíduos de cisteínas presentes na proteína: CXC ou β -quimiocinas (quando a quimiocina possui os dois primeiros resíduos de cisteínas separados por um aminoácido simples); CC ou α -quimiocinas (quando a quimiocina possui os dois primeiros resíduos de cisteína adjacentes); XC ou γ -quimiocinas (quando a quimiocina perdeu um dos resíduos de cisteína); CX₃C ou δ -quimiocinas (quando a quimiocina possui os dois primeiros resíduos de cisteína separados por três aminoácidos) (LUSTER, 1998; MURPHY, 2001; LIOTTA, 2001; KULBE *et al.*, 2004; ZOLTNIK, 2004; KAKINUMA; HWANG, 2006)

As duas maiores subfamílias de quimiocinas são as do grupo CXC e CC, cujas atividades biológicas diferem quanto à capacidade de estimular diferentes tipos de células efectoras. As quimiocinas CXC como a IL-8, o peptídeo ativador de neutrófilos (NAP)-2, o fator plaquetário(PF)-4, o peptídeo ativador de neutrófilos derivado de células epiteliais (ENA)-78, atraem preferencialmente neutrófilos para o sítio inflamatório (FIGARELLA-BRANGER *et al.*, 2003) enquanto que as quimiocinas CC (α -quimiocinas) como a eotaxina, a citocina regulada sob ativação (RANTES) que é expressa e secretada por células T normais e a proteína quimiotática para monócitos (MCP)-4 ativam predominantemente eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos.

Considerando a capacidade destas quimiocinas em promover quimiotaxia em outros tipos leucocitários, encontramos que quimiocinas CXC como as GRO-a, -

b e g. Quimiocinas pertencentes à classe XC e CX3C possuem maior seletividade para linfócitos, monócitos, linfócitos T e células NK ("*Natural Killer*"). (KAPP *et al.*, 1994; ELSNER *et al.*, 1996; ELSNER *et al.*, 1998; PETERING *et al.*, 1998; SYRBE; SIEKEVE, 1999; KAPLAN, 2001; FIGARELLA-BRANGER *et al.*, 2003).

Dentre as quimiocinas CXC em humanos, a IL-8 é considerada como uma das mais importantes para quimiotaxia e ativação de neutrófilos. Além de ter sido detectada em humanos, esta quimiocina também foi detectada em outras espécies de animais tais como coelhos e cães, entretanto, não foi encontrada em roedores como ratos e camundongos. Nesses animais, a CINC-1 em ratos e as quimiocinas KC e MIP-2 em camundongos, apresentam acentuada homologia com a seqüência de aminoácidos da IL-8 e das GRO humanas. Com relação aos camundongos, trabalhos demonstram que as quimiocinas KC e MIP-2 apresentam potente atividade quimiotática tanto em modelos experimentais *in vivo* como *in vitro* (FIGARELLA-BRANGER *et al.*, 2003).

Uma importante característica encontrada particularmente na família das quimiocinas CXC é a presença da seqüência de três aminoácidos (glutamato-leucina-arginina; ELR) localizados próximo ao N-terminal, precedendo a primeira cisteína. A presença desta seqüência ("motif") parece estar intimamente relacionada com a especificidade quimiotática sobre neutrófilos. Entre as quimiocinas CXC-ELR+ destacam-se a IL-8, o grupo das GRO, o ENA-78, o GCP-2, MIP-2, KC entre outras (ROLLINS, 1997; LAING; SECOMBES, 2004).

Muitas destas quimiocinas ao interagirem com receptores acoplados a proteína G produzem reorganização do citoesqueleto, firme adesão com células endoteliais e migração direcional. Acredita-se que estas proteínas agem coordenadamente com proteínas de superfície celular (integrinas) direcionando as células para sítios anatômicos específicos (MURPHY, 2001; LIOTTA, 2001; KULBE *et al.*, 2004).

Apesar de um grande número de citocinas atuar amplificando a inflamação e a dor, existem citocinas que agem modulando negativamente estes processos, desta forma, estas citocinas (antiinflamatórias e inibidoras de hiperalgesia) servem como agentes que equilibram durante o desenvolvimento de respostas

nocivas. Dentre estas citam-se: IL-1-4; IL-6; IL-10; IL-13, TGF- β ; INF- γ (CAVAILLON, 2001).

O óxido nítrico (NO) é um mediador inflamatório bastante versátil, apresentando efeitos pró e antiinflamatórios. O NO é um radical livre formado endogenamente por uma família de enzimas, óxido nítrico sintases (NOS) (EISERICH *et al.*, 1998), através da conversão de L-arginina em L-citrulina. Nos líquidos orgânicos, o NO produzido se oxida produzindo ânions nitrito (NO_2^-) e nitrato (NO_3^-), sequencialmente (IGNARRO *et al.*, 1987, MONCADA *et al.*, 1991). Foram identificadas três diferentes isoformas de NOS em células de mamíferos (produtos de diferentes genes): NOS endotelial (eNOS ou NOS III) encontrada em células endoteliais, epiteliais e miócitos cardíacos; NOS neuronal (nNOS ou NOS I) encontrada em neurônios, células musculares esqueléticas e neutrófilos (GREENBERG, *et al.*, 1998) e a NOS induzida (iNOS ou NOS II), encontrada em macrófagos, hepatócitos, células musculares lisas (TITHERADGE, 1999).

A eNOS e nNOS são classificadas como enzimas constitutivas e dependentes de cálcio, enquanto que a iNOS é classificada como uma enzima induzida, cujas ações independem de cálcio. A ativação de todas as enzimas NOS necessita dos seguintes cofatores: calmodulina, flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina adenina mononucleotídeo (FMN), tetrahidrobiopterina (THB4) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) (TITHERADGE, 1999).

O óxido nítrico tem efeitos disseminados em repostas fisiológicas e inflamatória. Nas células endoteliais, o NO produzido, difunde-se rapidamente para fora das células de origem para as células musculares lisas subjacentes, provocando relaxamento e, conseqüentemente, vasodilatação (IGNARO *et al.*, 1987; PALMER *et al.*, 1988). A vasodilatação que ocorre no processo inflamatório, induzida por diferentes agentes flogísticos (bradicinina, histamina, substância P, serotonina e trombina), é dependente da liberação de óxido nítrico (SICKER *et al.*, 2001; STOWE *et al.*, 2001; KARABUCAK *et al.*, 2005; WOTHERSPOON *et al.*, 2005; YOUSIF, 2005).

Além de promover o relaxamento da musculatura lisa, o NO desempenha outros papéis importantes na inflamação. Reduz a agregação e adesão plaquetária, é citotóxico para determinados microorganismos e células tumorais (ROBBINS *et al.*,

2005). Células endoteliais produzem e liberam NO, após a estimulação por citocinas como MCP-1, IL-6, M-CSF, ICAM-1 e VCAM-1 (TEDGUI; MALLAT, 2001).

A expressão de NOSi é regulada via fator de transcrição nuclear, dentre eles cita-se o fator de transcrição nuclear kappa B (NFkB) (ALDERTON *et al.*, 2001). Esta enzima pode ser induzida em células como macrófagos, células endoteliais, células da musculatura lisa vascular e miócitos cardíacos, após estímulo por LPS, citocinas (IL-1 β , TNF α , IFN- γ , IL-6), entre outros (CHAN; FISCUS, 2004).

1.2 DOR E NOCICEPÇÃO

A palavra dor representa uma categoria de fenômenos que compreende uma diversidade de experiências diferentes e únicas, tendo causas diversas e caracterizadas por qualidades distintas, variando com um certo número de critérios: somatosensoriais, viscerais, afetivos, culturais e cognitivos. Pelo fato de ser a dor uma sensação íntima e pessoal, é impossível conhecer com exatidão a dor do outro. Assim, pela diversidade das experiências dolorosas, explica-se porque tem sido muito difícil, até hoje, encontrar uma definição definitiva e satisfatória da dor (MELZAC; LOESER, 1999; RAINVILLE, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2004).

Apesar de ser uma reação complexa e de difícil definição, o conceito desta enfermidade vem evoluindo ao longo dos anos, e as grandes entidades de estudos com dor tentam criar conceitos cada vez mais completos e abrangentes. A Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP), definia dor em 1979 como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada o dano tecidual real ou potencial ou mesmo a nenhuma lesão, embora ainda assim descrita como termos sugestivos de que o dano tecidual tivesse de fato ocorrido. A mesma entidade reformulou o conceito que é aceito atualmente, e postula que a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada o dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termo de tal lesão (MELZAC; LOESER, 1999; RAINVILLE, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2004).

A dor é um sintoma de muitas desordens clínicas e afeta grande parte da população, estudos demonstram que a dor afeta os mais variados domínios da

qualidade de vida humana, desde os físicos até os emocionais. O efeito da dor está relacionado com características individuais como: intensidade, extensão, duração, significado dentre outros fatores. (BESSON; DICKENSON, 1997; NIV; KREITLER, 2001).

Apesar de ter sido considerado desde a antiguidade uma das grandes preocupações do ser humano, a dor é uma característica cardinal dos mecanismos protetores fisiológicos normais e uma das suas funções é preservar o organismo, evitando o dano tecidual. O sistema nervoso informa sobre a ocorrência ou perigo de injúria, e a sensação de dor contribui para esta função, estando portanto relacionado as reações de fuga e esquiva (BESSON; DICKENSON, 1997; RIEDEL; NEECK, 2001).

1.2.1 Classificação dos diferentes tipos de dor

Em termos temporais a dor pode ser classificada como (GRAEFF, 1984; TEIXEIRA; PIMENTA, 1994):

- 1) Aguda: tem função de alerta e caracteriza-se pela combinação de lesão tecidual, dor e ansiedade. Possui lapso de tempo muito curto, entre o afrontamento com a causa do ferimento e a preparação para o restabelecimento, geralmente, está associada com uma lesão identificável e desaparece após resolução deste processo patológico.

- 2) Crônica: É de longa duração e persiste mesmo após o tempo de cura da lesão, algumas vezes pode estar associada a uma lesão crônica que causa dor contínua e recorrente ou ainda pode estar associada a fatores ambientais e psicopatológicos. Geralmente, conduz a estresse, debilidade, alterações de sono, humor e apetite, podendo também gerar depressão profunda. Esta alteração nem sempre é associada à lesão evidente.

Quanto à fisiopatologia a dor também pode ser classificada em (RANG *et al.*, 2003):

- 1) Nociceptiva – ocorre quando existe um traumatismo nos receptores nociceptivos, devido a alterações na sua estrutura anátomo-funcional com liberação de substâncias algogênicas nos tecidos.
- 2) Neurogênica – é aquela que ocorre com o dano diretamente sobre as inervações.
- 3) Neuropática – resultante do processamento somatossensorial anormal ao nível periférico ou central, como, por exemplo, a dor do membro fantasma.
- 4) Inflamatória – caracterizada pela sensibilização dos neurônios produzida pela ativação da cascata de citocinas, as quais são substâncias de natureza peptídica, liberadas no tecido inflamatório e de células do sistema imunobiológico.
- 5) Dor psicogênica – é aquela que não possui causa orgânica, mas se expressa em consequências de problemas psicológicos (MENEZES, 1999).

1.2.2 Fisiopatologia da dor

A transmissão da dor está associada à atividade elétrica nas fibras nervosas aferentes primárias, que possuem terminações livres no tecido periférico (pele, músculos, articulações, vísceras, conjuntivo dentre outros) (RANG *et al.*, 1991; JULIUS; BASBAUM, 2001)

Estas terminações nervosas livres são receptores sensoriais especializados chamados de nociceptores (ativados por estímulos nocivos). Estes receptores possuem alto limiar de ativação sendo então ativados por estímulos intensos que são danosos ou potencialmente danosos aos tecidos, e, portanto não são recrutados em estímulos inócuos (CAILLIET, 1993; DJOUHRI; LAWSON, 2004).

Estes receptores sensoriais são representados por terminações livres de fibras mielínicas delgadas (fibras do tipo A δ ou tipo III) e fibras nervosas amielínicas (fibras tipo C ou tipo IV). As fibras A δ conduzem sinais de forma rápida (dor aguda e rápida), enquanto que as fibras tipo C apresentam condução lenta destes impulsos (dor lenta; queimação), onde esta última respondem a uma ampla variedade de estímulos (mecânicos, químicos, térmicos e isquêmicos), sendo portanto também

denominados de nociceptores polimodais (NESS; GEBHART, 1990; GUYTON; HALL, 1997; RAJA *et al.*, 1999).

Sugere-se ainda que além dos nociceptores polimodais, um grupo adicional denominado de nociceptores “silenciosos” (*silent nociceptors*) encontrados em articulações e vísceras são ativados durante estímulos químicos (processos inflamatórios) e térmicos, o que os torna responsivos até a estímulos somatossensoriais inócuos (RAJA, 1999; CERVERO, 2002; PORTO, 2004).

As fibras A β mielinizadas de grande diâmetro respondem aos estímulos inócuos (táteis, térmicos e proprioceptivos). Estas fibras apesar de não detectarem estímulos nocivos; são capazes de modular a percepção da dor pelos nociceptores (JULIUS; BASBAUM, 2001; BASBAUM; JESSELL, 2003).

A estimulação dos nociceptores periféricos faz com que a informação nociceptiva seja levada através das fibras aferentes ao SNC. Os longos axônios das fibras nociceptivas que se localizam em nervos periféricos estendem-se de seus corpos celulares contidos em uma estrutura denominada gânglio da raiz dorsal. Após emergir de seu corpo celular, o axônio aferente primário bifurca-se para enviar prolongamentos à medula espinhal e outro para inervar os tecidos corporais (MILLAN, 1999).

Na medula espinhal o corno dorsal é dividido em lâminas de acordo com as características citológicas dos neurônios e da divisão anatômica. A lâmina I contém neurônios que respondem a estímulos nocivos, a lâmina II é formada por interneurônios (excitatórios e inibitórios), a lâmina III e IV recebem aferências não nociceptivas das fibra A β e a lâmina V recebe aferências das fibras A β , A δ e C e de estruturas não viscerais (BASBAUM; JESSELL, 2003) .

A transmissão sináptica entre os neurônios aferentes primários e os neurônios do corno dorsal da medula espinhal é mediada, principalmente, pelo glutamato atuando em receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) e AMPA (α -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazoil ácido propiônico), além disso, diversas outras substâncias podem modular a transmissão na medula (ATP, prostaglandinas, substância P) (DOUBELL *et al.*, 1999).

Na medula, a transmissão dos sinais dolorosos após a liberação dos neurotransmissores envolve a participação de canais iônicos que quando modulados

geram correntes que despolarizam ou hiperpolarizam a membrana celular dos neurônios causando excitação ou inibição neuronal, assim facilitando ou dificultando a passagem do impulso para as vias ascendentes medulares (ALTIER; ZAMPONI, 2004). Os principais canais envolvidos nesses efeitos são os canais de sódio, os canais de cálcio operados por voltagem e os canais de potássio (LEE *et al.*, 2005).

Os neurônios do corno dorsal originam dois grupos de vias nociceptivas ascendentes. A via do grupo lateral: formada pelos tratos neoespinotalâmico, neotrigeminotalâmico, espinocervicotalâmico e sistema pós-sináptico da coluna dorsal, e a via do grupo medial: formada pelos tratos paleoespinotalâmico, paleotrigeminotalâmico, espinoreticular e espinomesencefálico. Todas essas vias convergem para o tálamo, que é capaz de receber e integrar parcialmente estas informações dolorosas e enviá-las para o córtex somatosensorial, que junto com o giro cingular (sistema límbico) e o córtex insular (sistema autonômico) processam a informação nociceptiva (MACHADO, 1988; CRAIG; DOSTROVSKY, 1999; BASBAUM; JESSELL, 2003).

1.2.3 Sistemas modulatórios da dor

A dor pode ser controlada por mecanismos centrais, uma vez que o sistema nervoso possui circuitos modulatórios que modificam a percepção da dor. O local principal desta modulação é a medula espinhal, onde a interconexão entre vias nociceptivas e não-nociceptivas podem controlar a transmissão da informação nociceptiva para os centros supra-espinhais (BASBAUM; JESSELL, 2003).

Em 1965, Melzac e Wall hipotetizaram a teoria da comporta, na qual sugeriram que a inibição pré-sináptica das vias nociceptivas na medula pode ser feita por interneurônios inibitórios presentes na substância gelatinosa do corno dorsal da medula espinhal. A ativação destes neurônios geraria potenciais negativos nas raízes sensoriais dificultando o aparecimento de potenciais nociceptivos capazes de serem transmitidos para o corno dorsal da medula espinhal.

Estruturas encefálicas também participam da analgesia, uma vez que a estimulação de regiões como a substância cinzenta periaquedutal produz analgesia profunda e seletiva sem comprometer outras formas de sensibilidade. A substância

cinzenta periaquedutal recebe aferências de diversas regiões (hipotálamo, córtex frontal e insular, amígdala, núcleo cuneiforme, *locus ceruleus*, tálamo, formação reticular e corno dorsal da medula espinhal), e ao ser estimulada ativa seus neurônios (ricos em encefalina, substância P e GABA-ácido γ -aminobutírico) que se projetam para o bulbo ventromedial dorsal (núcleo magno da rafe e formação reticular) onde neurônios descendentes ricos em serotonina e encefalinas inibem a transmissão nociceptiva (BEHBEHANI; FIELDS, 1979; URBAN; SHIMIT, 1994; VANEGAS; SCHAIBLE, 2004).

Além disso, neurônios noradrenérgicos do *locus ceruleos* e de outros núcleos bulbares e ponte bloqueiam os neurônios eferentes das lâminas I e V por ações indiretas e diretas, e estes mecanismos também interagem com circuitos opióides endógenos existentes no corno dorsal da medula espinhal (BASBAUM; JESSELL, 2003).

Desta forma, o corno dorsal da medula espinhal é o local onde estes neurônios eferentes serotoninérgicos e/ou noradrenérgicos fazem sinapses com os neurônios de projeção e interneurônios inibitórios encefalinérgicos, ainda nesta região a ativação de interneurônios inibitórios gabaérgicos inibe a liberação de neurotransmissores nociceptivos excitatórios (glutamato, substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) por neurônios de projeção (MALCANGIO; BOWERY, 1996).

Estes circuitos modulatórios são complexos e inúmeros, e além dos neurotransmissores já citados, agonistas de receptores D2 dopaminérgicos, de receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} e de receptores muscarínicos M₂ e M₄ também estão envolvidos na modulação inibitória das vias ascendentes da transmissão nociceptiva (GAO *et al.*, 2001; MA *et al.*, 2001).

Adicionalmente, a lesão tecidual ou nervosa acarreta a ativação de fibras aferentes primárias que aumentam a sensibilidade dos neurônios espinhais, desenvolvendo um fenômeno chamado de sensibilização central. Esta sensibilização resulta a ativação de vias intracelulares neuronais mediadas por proteína quinase C (PKC) e/ou tirosinas quinases, que atuam fosforilando e aumentando a atividade dos receptores NMDA, assim facilitando a transmissão sináptica (DOUBELL *et al.*, 1999). Em geral, a sensibilização central persiste até o término do estímulo nociceptivo

periférico, entretanto em alguns casos este processo pode se prolongar mesmo após o desaparecimento deste estímulo nociceptivo (DWORKIN *et al.*, 2003).

O fenômeno de sensibilização central juntamente com o de sensibilização periférica medeia os processos de hiperalgesia e alodínia (TREEDE *et al.*, 1992). A hiperalgesia é a resposta excessiva a estímulos nocivos, enquanto que a alodínia é a resposta nociceptiva a estímulos não nocivos (KIDD; URBAN, 2001). Além da sensibilização central, a sensibilização periférica contribui bastante para estas alterações. O processo inflamatório é o principal responsável pela sensibilização periférica, pois a liberação de diversos mediadores inflamatórios interfere na atividade das fibras sensoriais aferentes (ativando diretamente o nociceptor ou reduzindo o seu limiar de ativação),

1.2.4 Dor inflamatória

Diversos mediadores químicos são liberados por células não neuronais e neuronais no local da injúria (substância algogênicas) e surgem em decorrência de processos inflamatórios traumáticos ou isquêmicos. Estes mediadores não neuronais são comumente histamina, serotonina, bradicinina, citocinas, eicosanóides dentre outros, já os mediadores neuronais são principalmente a substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGPR), sendo estes mediadores neuronais liberados do pericário (corpo celular) para a periferia. Dependendo da natureza e concentração do mediador ele pode ativar diretamente o nociceptor e/ou reduzir seu limiar de ativação. As fibras mais associadas a este tipo de ativação são as fibras polimodais do tipo C e os nociceptores “silenciosos” (DAVIS *et al.*, 1989; HANDWERKER *et al.*, 1989; MCMAHON; KOLTZENBURG, 1990; FERREIRA 1993a).

Neste contexto as células residentes (principalmente macrófagos e mastócitos) parecem ter papel primordial neste processo, pois estas células sinalizam a presença de injúria ou material estranho, através da liberação de variados mediadores inflamatórios, que além de atuar no nociceptor, recrutam células inflamatórias (polimorfonucleares, linfócitos) que produzem um efeito amplificador na inflamação e nocicepção (FERREIRA 1993a).

1.2.5 Mediadores com ação nos nociceptores

Dentre os mediadores algogênicos diretos (estimulam diretamente o nociceptor) a bradicinina apresenta efeitos bastante versáteis, além de atuar diretamente nos nociceptores, também apresenta efeitos hiperalgésicos. Existem quatro subtipos de receptores de bradicinina (BK1-BK4). Os receptores BK2 foram associados a ativação direta das fibras aferentes, além da estimulação da síntese de uma cascata de citocinas capazes de gerar a produção de mediadores hiperalgésicos (prostaglandinas e aminas simpatomiméticas) (FERREIRA *et al.*, 1993b). Os receptores BK1 parecem estar associados com a ativação direta do nociceptor, porém estes receptores parecem ser capazes de interagir com os receptores BK2 (TONUSSI; FERREIRA, 1997.)

A histamina encontrada, principalmente, no interior de mastócitos parece atuar diretamente no nociceptor induzindo sensação de dor e prurido (FERREIRA *et al.*, 1990). Adicionalmente, outros mediadores são capazes de atuar diretamente no nociceptor tais como: ATP (adenosina trifosfato), serotonina, substância P e prótons (RANG *et al.*, 1991).

Outros mediadores porém podem alterar o potencial de repouso destes neurônios periféricos facilitando a formação de um potencial de ação por outros estímulos, sendo chamados de mediadores hiperalgésicos.

As substâncias hiperalgésicas parecem ser capazes de aumentar a concentração intracelular de AMPc e Ca^{++} gerando uma redução no limiar de ativação das fibras nociceptivas periféricas. Assim, prostaglandinas e aminas simpatomiméticas (dopamina e noradrenalina) atuam através deste mecanismo. Isso foi justificado por estudos que demonstram que a administração de prostaglandinas ou agonistas adrenérgicos produzem efeito hiperalgésico, e que a administração de antagonistas destas substâncias diminuem este efeito (FERREIRA 1972; WEISENFELD-HALLIN; HALLIN, 1984; FOLLENFANT *et al.*, 1990).

Além disso, substâncias capazes de induzir a formação de prostaglandinas e aminas simpatomiméticas (IL-1; IL-8; TNF- α) podem ser também considerados mediadores hiperalgésicos. (NAKAMURA; FERREIRA 1987;

FERREIRA *et al.* 1978a; FERREIRA *et al.*, 1993a). TNF- α é capaz de induzir a síntese de IL-1, IL-6 e IL-8, estas citocinas por sua vez induzem a síntese de mediadores hiperalgésicos como prostaglandinas e aminas simpatomiméticas (CUNHA *et al.*, 1991; 1992; DUARTE *et al.*, 1988; THOMAZZI, 1996). TNF- α e IL-1 também induzem a síntese e secreção de quimiocinas e citocinas, provocando indiretamente a migração de neutrófilos para o foco inflamatório e algogênico. Adicionalmente, IL-1 induz diretamente a produção dos mediadores hiperalgésicos já citados (prostaglandinas e aminas simpatomiméticas) (FACCIOLI *et al.*, 1990; PERRETTI; FLOWER, 1993)

O óxido nítrico também apresenta atividades significantes na nocicepção, a estimulação da guanilato ciclase com aumento da produção de GMP_c (guanosina monofosfato cíclico) parece ser capaz de produzir dessensibilização dos nociceptores, e a descoberta da via L-arginina/Oxido nítrico/GMP_c estimulou a investigação da participação do óxido nítrico como substância antinociceptiva (FERREIRA *et al.*, 1991).

Os dados a respeito da ação do óxido nítrico na atividade nociceptiva são bem contraditórios, foi demonstrado que inibidores de NOS como o L-NAME (L-nitro arginina metil éster) produz efeitos antinociceptivos centrais e periféricos (MOORE *et al.*, 1991; ROCHA, 2002). Entretanto outros estudos tem demonstrado que o óxido nítrico é um modulador negativo da resposta nociceptiva, e que a administração de NO causa analgesia acompanhada de aumento na produção de GMP_c nos neurônios sensoriais periféricos primários (FERREIRA *et al.*, 1991; DUARTE *et al.*, 1992). Ferreira *et al.* (1999) demonstraram que a administração de doadores de óxido nítrico bloqueia a hiperalgesia induzida por PGE₂, e esse efeito é revertido por L-NAME (L-nitro arginina metil éster) e azul de metileno (inibidor de guanilato ciclase). Ferreira *et al.* (1991) proporam ainda que opióides e analgésicos periféricos como dipirona e diclofenaco causam analgesia por estimular a via L-arginina/óxido nítrico/ GMP_c.

Assim, diversos mediadores do processo inflamatório apresentam atividades diferenciadas e complexas nos nociceptores, isso implica em uma grande interação entre o processo inflamatório e a dor, além de justificar a pesquisa de substâncias antiinflamatórias em processos algogênicos.

1.3 LECTINAS

Carboidratos agem como intermediários na comunicação celular em vários sistemas biológicos e podem influenciar fenômenos de diferenciação, proliferação e interações entre células em condições fisiológicas e patológicas. As informações presentes na estrutura dos oligossacarídeos conjugados a proteínas ou lipídios na superfície das células são reconhecidas por um grupo especializado de proteínas, denominadas lectinas (SANZ-APARICIO *et al.*, 1997).

Os carboidratos apresentam grande versatilidade de ligação, inclusive com outras moléculas de natureza distinta (lipídios, proteínas, grupos funcionais, como fosfato, sulfato, acetil). Esta capacidade de ligação permitiu estas estruturas originarem uma grande variedade de moléculas, fazendo com que este grupo de biomoléculas desenvolvessem capacidade de codificar diversos processos celulares (SCHMIDT, 1987). As lectinas são capazes de se ligar e reconhecer a informação contida nestas moléculas, modulando desta forma diversos processos biológicos nas mais diferentes espécies (LAINE 1994; BREWER *et al.*, 2002).

Atividades biológicas lectinas foram descritas por Stillmark (1988), que observou a aglutinação de hemácias quando estudava o efeito tóxico de extratos de semente de mamona (*Ricinus communis*) sobre o sangue, sendo que posteriormente se confirmou que o material responsável pela hemaglutinação era uma proteína, a qual foi chamada posteriormente de ricina. Atualmente, se sabe que a ricina é na verdade uma complexa mistura de moléculas tóxicas e lectinas não-tóxicas.

Estas proteínas têm sido encontradas em larga escala, em uma variedade de formas de vida – microrganismos, mamíferos e vegetais - sendo que aquelas encontradas nos vegetais superiores têm sido as mais estudadas (OTTENSOOSER *et al.*, 1974).

1.3.1 Lectinas: Definição e Classificação

O termo lectina é derivado da palavra, do latim, “*legere*” que significa capacidade de escolher. Este termo foi sugerido por lembrar o aspecto seletivo de ligação dessas proteínas aos eritrócitos humanos (BOYD; SHAPLEIGH, 1954).

Atualmente, o conceito mais aceito para lectinas é proposto por Peumans e Van Damme (1995), na qual lectinas são (glico) proteínas de origem não imune que possuem no mínimo um domínio não-catalítico e que se ligam reversivelmente e especificamente a um mono ou a um oligossacarídeo. Essa ligação a resíduos de carboidratos pode ser de alta especificidade sem, contudo alterar a estrutura química dos ligantes (GRANJEIRO, 1996).

Outros autores como Sharon e Lis (1972) definiram lectinas, como sendo proteínas aglutinadoras de células com especificidade de reconhecimento por carboidratos. Ainda, Goldstein *et al* (1980) confirmou esse conceito, e acrescentou que lectinas são proteínas/glicoproteínas de origem não imune com especificidade de ligação a carboidratos, e capazes de aglutinar células e/ ou precipitar glicoconjugados.

O termo que classifica as lectinas como proteínas de origem não imune distingue as lectinas de anticorpos anti-carboidratos que também são capazes de aglutinar células. Enquanto, as lectinas diferem em vários aspectos como a composição e sequência de aminoácidos, peso molecular, requerimento de metais e estrutura tridimensional, os anticorpos são estruturalmente similares a estas lectinas, porém sem estes aspectos. Além disso, as lectinas também são encontradas em plantas e bactérias, que não possuem sistema imune (MOREIRA *et al.*, 1991).

Peumans e Van Damme (1995), além de propor uma definição para as lectinas, lançaram a classificação atualmente aceita para essas proteínas, de acordo com seus sítios de atividade biológica, dividindo-as em três grupos: Merolectinas, Hololectinas e Quimerolectinas.

As merolectinas são biomoléculas que apresentam apenas um domínio lectínico, sendo assim incapazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados.

Como representantes dessa classe tem-se as lectinas de orquídea, específicas para manose.

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

As quimerolectinas são lectinas que possuem um ou mais sítios de ligação a carboidratos, além de possuir outro sítio não lectínico com atividade biológica. As proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2 (RIPs) e as quitinases podem ser citadas como exemplos dessa classe.

Posteriormente, Peumans e Van Damme (1998) adicionaram a essa classificação o conceito de Superlectina. Esse termo é reservado a algumas lectinas, como a lectina de tulipa que apresenta dois ou mais sítios lectínicos, porém com especificidades a carboidratos diferentes.

1.3.2 Efeitos biológicos de lectinas vegetais

Acredita-se que uma das principais funções de lectinas vegetais seja, em condições normais, a estocagem de proteínas, transporte de carboidratos e prováveis funções de defesa contra agressores exógenos. Quando algumas lectinas são ingeridas podem causar no trato gastrointestinal sensações de náusea, vômitos, processos alérgicos e inflamatórios, fazendo com que possíveis predadores evite ingerí-las. Algumas lectinas também apresentam efeitos inseticidas e inibidor do desenvolvimento de larvas (MURDOCK *et al.*, 1990).

Classicamente, lectinas são utilizadas em estudos como a “tipificação” de eritrócitos, carregamento de agentes quimioterapêuticos para células tumorais específica, agentes mitógenos. Essas biomoléculas possuem capacidade de aglutinar eritrócitos, linfócitos, fibroblastos, espermatozóides, fungos, bactérias e células vegetais (GOLDSTEIN *et al.*, 1980).

Carboidratos, glicoconjugados e lectinas são de fundamental importância para a adesão, colonização e patogênese em diversos processos celulares (bactérias, células cancerígenas). Desta forma, Beuth *et al.* (1995) conseguiram inibir a adesão de *Streptococcus pneumoniae* em pulmão de camundongos com a

administração de Glc-Nac. Shlyakhovenko *et al.* (1995) sugeriram que lectinas promovem adesão de células tumorais a tecidos alvos e favorecem metástases. Posteriormente, Alguns autores também demonstraram atividade anti-tumoral (ANDRADE *et al.*, 2004) e indução de apoptose em células tumorais por lectinas vegetais (HOSTANSKA *et al.*, 2003).

Com relação à atividade imunoestimulante e pró-inflamatória lectinas estão associadas com diversas atividades: mitose em linfócitos humanos e indução de produção de interferon- γ (BARRAL-NETO *et al.*, 1992; MACIEL *et al.*, 2004); liberação de histamina por mastócitos peritoneais de ratos (GOMES *et al.*, 1994); e migração de leucócitos e formação de edema de pata (ALENCAR *et al.*, 2003, 2004, 2007; ALENCAR *et al.*, 2005b, 2005c, 2005d), e produção de óxido nítrico por células peritoneais murinas e por tecido obtido de aortas de ratos isoladas *in vitro* (KLEHA *et al.*, 1991; ANDRADE 1999; LIMA *et al.*, 2004; GADELHA *et al.*, 2005).

Apesar do bem comprovado potencial pró-inflamatório, resultante da administração local de lectinas, nosso grupo já demonstrou que, lectinas vegetais administradas endovenosamente apresentam potente ação antiinflamatória (ASSREUY *et al.*, 1997, ALENCAR *et al.*, 1999, 2005a; MOTA *et al.*, 2006; SANTI-GADELHA *et al.*, 2006). Além da inibição de eventos inflamatórios agudos, demonstrou-se ainda que estas lectinas previnem a lesão urotelial no modelo de cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida em camundongos (ASSREUY *et al.*, 1999).

No tocante a nocicepção, poucos trabalhos têm relacionado efeitos antinociceptivos de lectinas. Somado a isso, estes trabalhos são realizados com lectinas de algas. Recentemente, Neves *et al.* (2007) demonstraram atividade antinociceptiva em camundongos de uma lectina de alga de *Amansia multifida* administrada por via intraperitoneal e oral em modelos de ácido acético, formalina e placa quente, este efeito parece ser mediado, parcialmente, pelo sistema opióide. Atualmente, Bitencourt *et al.* (2008) demonstraram efeitos antinociceptivos e antiinflamatórios de uma lectina de alga vermelha *Hypnea cervicornis* nos mesmos modelos (contorções induzidas por ácido acético, teste da formalina e teste da placa quente), e este efeito parece estar envolvido com a redução da migração de neutrófilos para o sítio da injúria.

1.3.3 *Lonchocarpus sericeus*

Lonchocarpus sericeus (Poir.) Kunth é uma angiosperma dicotiledônea (figura 1) da subclasse Archichlamydeae que pertence à ordem Rosales e à família Leguminosae papilionaceae (EVANS, 2002). A família Leguminosae é a segunda maior família de plantas floríferas, possuindo cerca de 600 gêneros e 12.000 espécies. Esta família é dividida em três subfamílias: Mimosoideae, Caesalpinoideae e Papilionaceae, contendo, respectivamente, cerca de 40, 133 e 377 gêneros (EVANS, 2002). Sua distribuição é bastante ampla nas zonas tropicais e subtropicais, estendendo-se ainda às regiões temperadas. Contudo, sua maior diversidade encontra-se nos trópicos americanos e africanos (MARTINS DE SOUSA, 2003).





Figura 1 – Foto de um espécimen de *Lonchocarpus sericeus* (a). Destaque para frutos (b) e inflorescências (c).

No Brasil, *L. sericeus* (Poir.) Kunth é encontrada no norte (Pará); nordeste (Alagoas, Paraíba, Ceará, Bahia, Maranhão, Pernambuco, Piauí); centro-oeste (Goiás e Mato-grosso); sudeste (Espírito Santo e Rio de Janeiro). Além disso, é encontrada na África, América central, Ásia, Austrália, Colômbia e Caribe (AZEVEDO-TOZZI, 1989; INTERNATIONAL LEGUME DATABASE & INFORMATION SERVICE, 2004).

A *L. sericeus* é uma espécie caducifólia com flores muito vistosas e perfumadas (na América e África), sendo frequentemente visitadas por insetos, especialmente abelhas. Esta espécie possui tamanho variando de 2 a 30 m. Sua casca é amarelada e rugosa e sua copa é ampla densa e difusa. O fruto é verde ou marron e densamente revestido por indumento ferruginoso, apresentando constrictões de tamanhos variados entre as sementes (Figura 1) (AZEVEDO-TOZZI, 1989).

No sertão nordestino a espécie é conhecida por ingazeiro (DUCKE, 1953) e em Fortaleza, no Ceará, por ingá ou ingá-bravo (MARTINS DE SOUSA, 2003). Ainda no Ceará, a espécie é chamada de ingá-de-bucha, ingáim, ingá-pena-de-buchas, ingareira-piaba e guará-timbó. Também nominado vulgarmente de cabelouro (Bahia), imburana, muxiba ou muxibeira (Maranhão), ingá-hi (Espírito Santo), ingarana (Piauí), piaca (Pernambuco) e priaca (Paraíba) (AZEVEDO-TOZZI, 1989). Outras denominações como carrapato, embira de carrapato, imbira de sapo,

tamboril (PIO CORRÊA, 1974), angelim, cabelouro da caatinga e timbó, também são usadas no Brasil.

L. sericeus (Poir.) Kunth é encontrada com freqüência à margem de cursos d'água, onde deve apresentar uma freqüência mediana ou alta. Ocorre em formações florestais, como mata de galeria, mata costeira, mata virgem e alta, mata secundária, mata de várzea ou de terra firme, floresta estacional semidecidual. Coletada também em estepe arbórea aberta, carnaubal, restinga devastada, caatinga, capoeira e savana. Citada em mata seca e sertão nordestino (DUCKE, 1953) e baixadas pantanosas da Amazônia (DUCKE, 1925; 1949). Parece interessante mencionar que as árvores mais altas (20 – 30 m de altura) devem ser provavelmente, mais velhas e foram localizadas em matas virgens altas e fechadas no Pará, Venezuela e Costa Rica.

Apesar do gênero *Lonchocarpus* ser extremamente estudado e rico em alcalóides, flavonóides, inclusive chalconas, na literatura especializada, poucos trabalhos mostram que a *L. sericeus* tenha sido estudada farmacologicamente. Alguns estudos relatam à presença de um alcalóide isolado da raiz da mesma (2,5-Dihidroxi-metil-3,4-dihidroxipirrolidina) capaz de inibir o processamento de glicoproteínas (ELBEIN *et al.*, 1984). Segundo estudos realizados na Universidade Federal do Ceará (UFC), a *L. sericeus* contém os seguintes flavonóides (chalconas): Derricina, *Lonchocarpina*, 2,3-Diidrolonchocarpina e *Isolonchocarpina*, sendo que as duas primeiras chalconas são seus constituintes majoritários (MARTINS DE SOUSA, 2003). Algumas destas substâncias isoladas da raiz deste vegetal já apresentam atividade farmacológica, descrita, como as chalconas que apresentaram atividade citotóxica em diversos tipos celulares (CUNHA *et al.*, 2003b).

A lectina utilizada neste estudo é um tetrâmero com 100 Ka isolada de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (LSL). LSL apresenta um N-terminal majoritário com uma cadeia α de 23555 ± 15 Da (PAGE-SDS). Esta lectina é rica em resíduos de asparaginina, glutamina e leucina e não apresenta resíduos de cisteína e tirosina, além disso, apresenta afinidade de ligação por N-acetil-glicosamina e α -metil-glicopiranosídeo (SÉRVULO, 2004). LSL possui efeitos farmacológicos já demonstrados na literatura. Alencar *et al.* (1999) apresentaram o primeiro efeito biológico desta lectina, destacando sua habilidade em inibir o edema de pata (carragenina) e a migração de neutrófilos (carragenina) para a cavidade peritoneal

de ratos. Esta mesma lectina também apresentou atividade antiinflamatória (inibição da migração de neutrófilos) e antimicrobiana (redução do número de bactérias viáveis) em modelo de peritonite infecciosa (ligação e punção cecal) em ratos (ALENCAR *et al.*, 2005a).

1.4 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Apesar do recente progresso no desenvolvimento de novas drogas com fins terapêuticos, ainda existe uma busca exaustiva por antiinflamatórios e/ou analgésicos potentes e efetivos. Atualmente, uma das drogas analgésicas mais importantes e utilizadas na prática clínica continua sendo o alcalóide morfina, que apesar da eficácia apresenta diversos efeitos colaterais (depressão respiratória; náusea; vômito; tolerância; dependência, redução da motilidade gastrointestinal). Da mesma forma, os antiinflamatórios utilizados (inibidores de ciclooxigenase e corticóides), também possuem inúmeros efeitos colaterais (gastrite, úlcera gástrica, alterações hemostáticas, predisposição a infarto agudo do miocárdio dentre outros)

O estudo dos mecanismos e dos mediadores envolvidos na inflamação e dor vem sendo alvo de inúmeras pesquisas ao longo dos últimos anos. Assim, o estudo de substâncias naturais que possam interferir neste complexo processo biológico é de extrema relevância, uma vez que a maioria destas substâncias (incluindo as lectinas) são geralmente de baixo custo e fácil obtenção. Adicionalmente, diversos produtos naturais obtidos de diferentes espécies vegetais tem apresentado eficientes atividades antiinflamatórias e antinociceptivas além de contribuir no conhecimento das complexas vias relacionadas com a inflamação e dor.

O estudo das lectinas vegetais vem demonstrando crescente interesse por diversos pesquisadores, uma vez que as sementes deste vegetais possuem altas concentrações protéicas (propiciando, geralmente, um bom rendimento) e estas moléculas e apresentam uma certa facilidade de isolamento. Os dados da literatura, mostram efeitos de diversas lectinas sobre o processo inflamatório com envolvimento de vários mediadores, somado a isso, já são bastante demonstrados a associação destes mediadores inflamatórios com os mecanismos que estão envolvidos na ativação e sensibilização dos nociceptores.

Pesquisa de atividades biológicas, com lectinas na nocicepção é algo novo, e poucos resultados sobre este assunto são encontrados na literatura, estes trabalhos geralmente envolvem somente lectinas de algas e nada é encontrado a respeito de atividade antinociceptiva de lectinas vegetais. Assim, este estudo pode sugerir uma aplicabilidade biotecnológica para lectinas como substâncias úteis na compreensão do processo inflamatório e algogênico e na construção de medicamentos alternativos.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a atividade antiinflamatória e antinociceptiva, da lectina obtida de sementes de *Lonchocarpus sericeus* em modelos experimentais com camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 RELACIONADOS À ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA

- Avaliar a atividade da LSL sobre a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por estímulo inflamatório inespecífico (carragenina) e antigênico (ovoalbumina em animais imunizados);
- Investigar o efeito da LSL sobre o rolamento e adesão dos leucócitos no endotélio vascular por microscopia intravital;
- Em extensão ao estudo do mecanismo de ação antiinflamatória da LSL, estudar seu efeito na liberação de quimiocinas (CCL3; CXCL1 e CXCL2) e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF- α) na cavidade peritoneal estimulada com carragenina;
- Estudar a participação do óxido nítrico (NO) na atividade antiinflamatória da LSL;
- Verificar efeito da LSL sobre quimotaxia de neutrófilos *in vitro*

2.2.1 RELACIONADOS À ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

- Avaliar atividade antinociceptiva da LSL em modelos experimentais com estímulos químicos (ácido acético e formalina) e térmico (placa quente);

- Investigar a atividade antihiperálgica da LSL em modelos experimentais de hiperálgia mecânica (von frei) induzida por carragenina e prostaglandina E₂, e por ovoalbumina em animais imunizados;
- Avaliar o efeito da LSL na liberação de quimiocinas (CCL3; CXCL1 e CXCL2) e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e TNF- α) na pata dos animais estimuladas com carragenina;

2.2.1 RELACIONADOS À TOXICIDADE E A INVESTIGAÇÃO DE POSSÍVEIS EFEITOS CENTRAIS

- Investigar a ação da LSL na atividade locomotora de camundongos através de modelos de rota rod e campo aberto;
- Investigar a ação da LSL em modelos de depressão em camundongos (nado forçado);
- Avaliar efeitos sistêmicos do tratamento com a LSL através da avaliação dos parâmetros: leucograma, massa corpórea, aspecto macroscópicos de órgãos vitais, função renal, função hepática;

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LECTINA

As sementes quiescentes de *Lonchocarpus sericeus* foram coletadas na Chapada do Araripe (Crato-Ce). Todo o material foi devidamente identificado por especialistas do herbário Prisco Bezerra do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará (UFC). Posteriormente, as sementes foram trituradas em multiprocessador, a farinha foi peneirada, delipidada com N-hexano, seca ao ar livre e armazenada em frascos hermeticamente fechados e mantidos a temperatura ambiente para uso posterior.

A lectina foi isolada e purificada através de uma combinação de cromatografia de afinidade em coluna de quitina e cromatografia de troca iônica em coluna de mono-Q (SÉRVULO, 2004). Para avaliar o grau de pureza da amostra foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e 2-mercaptoetanol e eletroforese bidimensional (SÉRVULO, 2004). Estes procedimentos foram realizados no do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC), sob a coordenação do professor Dr. Benildo Sousa Cavada.

3.2 DROGAS E REAGENTES

- Ácido acético (PA - Grupo Química Brasil);
- Ácido etilenodiamino tetra-acético (Merck);
- Ácido sulfúrico (Merck);
- Adjuvante de Freund's completo – CFA (Sigma);
- Albumina sérica bovina (Sigma);
- Álcool iodado;
- Anticorpo biotinilado anti-IgG de camundongo (Dako);
- Anticorpo biotinilado de interleucina 1 (Dako);

- Anticorpo biotinilado KC (Dako);
- Anticorpo biotinilado MIP-1 (Dako);
- Anticorpo biotinilado MIP-2 (Dako);
- Anticorpo biotinilado TNF- α (Dako);
- Avidina – horseradish peroxidase (Dako A/S, Denmark);
- Brometo de hexadeciltrimetilamônio (Sigma);
- 1,2-Fenilenodiamina (Sigma);
- Carragenina (Sigma);
- Diazepam (Roche);
- Dihidroclor de 1,2-fenilenodiamina (ortofenileno diamina, OPD) (Sigma);
- Eosina (Reagen);
- Formol (PA – Merck);
- Fosfato de sódio (Cequímica);
- Glicose (Cequímica);
- Gradiente de Ficoll Hypaque (Sigma);
- Gradiente de Percoll 65% (Sigma);
- Hematoxilina (Reagen);
- Heparina (ampolas de 5.000 UI/ml; HEPARIN®) (Cristália);
- Hidrato de Cloral (Roche);
- N-1-Naftil-etilenodiamino-dihidrocloreto 1 % (Sigma);
- Ovalbumina (Sigma);
- Peróxido de Hidrogênio (Merk);
- Kits laboratoriais para dosagem: Uréia, Creatinina, AST, ALT. (LABTEST®);
- Solução de Ringer Locke's (Merk);
- Solução Salina – Cloreto de sódio estéril a 0,9% (Pharmace);

- Solução de Turk (Ácido acético e violeta de genciana-Isofar)
- Soro de cabra (Peptotec);
- Soro de carneiro (Peptotec);
- Sulfanilamida (Sigma);
- Sulfato de morfina (Cristália-Brasil);
- Prostaglandina E₂/PGE₂ (Sigma);
- Tetrametilbenzidina (Sigma);
- Tribromo etanol (Sigma);
- Tween 80 (Merck);

3.3 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS

- Agitador para tubos de ensaio mod. TE089 (MARCON);
- Agitador magnético Thermolyne, mod M37510/26;
- Agulhas 29G e 25 G;
- Aparelho para ELISA “enzyme-linked immunosorbent assay” (NEUROPROBE Inc. CABIN JOHN, MD);
- Alicates para deslocamento cervical;
- Balança para pesagem dos animais, modelo ID-1500 (FILIZOLA);
- Balança analítica, digital modelo 260 (MARTE);
- Banho -maria modelo 100 (FANEN);
- Base emborrachada para permanência do animal;
- Bastão de vidro;
- Beckers de 5, 10 e 50 mL;
- Câmara de Neubauer;
- Campo aberto (insight)-Brasil;

- Cânulas de polietileno (PE 50);
- Citocentrífuga mod. 248 (FANEM);
- Espectrofotômetro;
- Geladeira e freezer;
- Instrumental cirúrgico (pinças, bisturis, tesouras, agulhas, etc.);
- Lâminas e lamínulas para microscopia;
- Luvas descartáveis;
- Placa para ELISA 96 poços (NEUROPROBE Inc. CABIN JOHN, MD);
- Placa quente (Power lab);
- Rota Rod (insight)-Brasil;
- Seringas de insulina 0,5 cc com agulha 29G ultrafina (13 x 3,3), de 1 e de 5 mL (BENSON - DIKSON);
- Medidor de pH (pHmetro, MICRONAL);
- Micropipetas automáticas (GILSON);
- Microscópio óptico binocular (Olympus);
- Pletismômetro Hugo Basile (7140);
- Power Lab/8sp, AD Instruments®;
- Tubos plásticos de 15 mL (FALCON);
- Von Frey (PanLab).

3.4 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*) machos, pesando entre 25 a 35 gramas. Todos os animais foram provenientes do Biotério Central do Campus do Pici – UFC e mantidos no Biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (UFC). Todos foram acondicionados em gaiolas apropriadas, sob condições

adequadas de luz e temperatura, recebendo água e ração *ad libitum*, permanecendo nas mesmas condições ambientais durante os experimentos.

Os protocolos utilizados nesse trabalho estão de acordo com os padrões éticos estabelecidos pelo comitê de ética da Universidade Federal do Ceará.

3.5 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DA LECTINA DE SEMENTES *Lonchocarpus sericeus* – LSL: EFEITO SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS

Considerando o potencial antiinflamatório da LSL e a reversibilidade deste efeito (quando esta lectina era administrada com seu açúcar ligante específico N-acetilglicosamina), demonstrados anteriormente por Alencar *et al.* (1999) no modelo de migração de neutrófilos induzida por carragenina, um estímulo inespecífico. Decidiu-se investigar aqui o mecanismo de ação e os mediadores envolvidos no efeito da LSL neste modelo. Em acréscimo, avaliou-se também o efeito da LSL sobre a migração de neutrófilos induzida por ovalbumina (OVA) em animais pré-imunizados. Neste modelo o processo inflamatório é desencadeado por um estímulo antigênico (OVA), que é especificamente reconhecido pelo sistema imunológico, ou seja, uma resposta imunológica adaptativa.

3.5.1 Avaliação do efeito da Lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* sobre a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por carragenina (Cg)

Os camundongos receberam por via i.p. carragenina (Cg;500 µg/cavidade) dissolvida em 0,5 mL de salina estéril. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 horas após. Para tanto, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Em seguida, as células presentes na cavidade peritoneal foram coletadas através da lavagem desta injetando-se 3,0 mL de salina contendo 5 UI/mL de heparina. Os abdomens dos animais foram levemente massageados, e através de uma incisão foram coletados os fluidos peritoneais, com pipeta Pasteur de plástico.

As contagens total e diferencial dos leucócitos foram realizadas conforme metodologia descrita anteriormente por Souza e Ferreira (1985). Neste procedimento, 20 µL do fluido coletado de cada animal foram diluídos em 380 µL do

reagente de Turk e posteriormente usados para a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer. A contagem diferencial das células foi realizada através de esfregaços corados em lâminas, para tanto, 50 μ L do exsudato foram centrifugados em citocentrífuga a 400 x g, durante 10 min, após este processo os esfregaços foram corados pelo método da hematoxilina-eosina (HE) e as células contadas através de microscopia óptica sendo os resultados expressos como a média \pm E.P.M. do número de células x 10^3 /mL de fluido peritoneal.

A LSL (3 e 10 mg/Kg) foi administrada por via endovenosa em 0,1 mL de salina, 15 minutos antes da injeção da Cg. Para controle negativo do experimento foram utilizados camundongos que receberam salina estéril e.v.

3.5.1.1 *Efeito da Lectina de sementes de Lonchocarpus sericeus sobre rolamento e adesão dos leucócitos induzidos por Cg na microcirculação mesentérica (modelo de microscopia intravital)*

A avaliação do rolamento e adesão dos leucócitos ao endotélio vascular foi realizada por microscopia intravital através de procedimentos previamente descritos (BAEZ, 1969; RHODIN, 1986; FORTES *et al.*, 1991). Camundongos machos receberam LSL na dose de 10 mg/Kg e.v. ou salina, 15 minutos antes do estímulo inflamatório Cg (500 μ g; i.p.). Posteriormente, os animais foram anestesiados com injeção i.p. de solução salina contendo 250 mg/kg de tribromo etanol. Através de uma incisão lateral cutânea na cavidade abdominal, o mesentério foi exteriorizado para a observação da microcirculação *in situ*. Os animais foram mantidos sobre uma placa aquecida (37°C), dotada de área transparente, sobre a qual o tecido foi fixado. A preparação foi mantida úmida e aquecida por irrigação com solução de Ringer-Locke ou salina estéril a 37°C. A placa aquecida foi mantida sobre o *charriot* de um microscópio óptico tri-ocular, ao qual estão acoplados um fototubo, com sistema de lentes ampliadoras superpostas, um monitor de computador e um vídeo que permite a projeção e gravação de imagem com aumento final de 3400 vezes (BAEZ, 1969)

Os vasos selecionados para o estudo foram vênulas pós-capilares com diâmetro variando 10 a 18 μ m. Duas horas após o estímulo inflamatório (Cg), foi

avaliado o rolamento dos leucócitos e o número destes aderidos ao endotélio durante 5 minutos em uma extensão de 10 μm de vênula. Esta extensão é definida na tela do monitor: 10 μm no tecido correspondem a 3,4 cm na tela (FORTES *et al.*, 1991), portanto os resultados foram expressos em rolamento celular/10 $\mu\text{m}/\text{min}$ e células aderidas/10 μm^2 . Foram considerados os leucócitos que permaneceram aderidos ao endotélio vascular por mais de 30 segundos (GRANGER *et al.*, 1989). Duas determinações numéricas foram feitas por animal, estimando-se o resultado como média de ambos.

3.5.1.2 *Efeito da Lectina de sementes de Lonchocarpus sericeus sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas na cavidade peritoneal estimulada com Cg*

As concentrações das citocinas (TNF- α e IL-1 β) e das quimiocinas (MIP-1/CCL3), (KC/CXCL1) e (MIP-2/CXCL2) foram determinadas por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) no líquido peritoneal dos animais pré-tratados com salina e LSL (3 e 10mg/Kg) e.v. 15 min antes da administração da Cg i.p. (500 $\mu\text{g}/\text{cav}$). Grupo controle negativo recebeu somente salina i.p. Duas horas após a injeção da Cg o fluido peritoneal foi coletado como descrito no item 3.5.1. em 1,0 mL de salina e estocado a -70 ° C para posterior dosagem das citocinas e quimiocinas.

O ensaio para determinação da concentração de TNF- α , IL-1 β , MIP-1 e KC foi realizado baseado em protocolo descrito anteriormente por Taktak *et al.* (1991). Placas de microtitulação (96 poços) foram recobertas com 50 μL de tampão PBS contendo 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do anticorpo monoclonal (mAb) anti-TNF- α , anti IL-1 β , anti MIP-1 e anti KC. A placa foi incubada durante uma noite a 4°C. Após esse período, a placa foi lavada de 3 a 5 vezes com PBS contendo 0,1% Tween 20 (PBS-T; 200 $\mu\text{L}/\text{poço}$), e em seguida foram incubadas com 50 μL de solução de bloqueio (1% de albumina bovina) durante 2 h em temperatura ambiente. A placa foi lavada conforme descrito acima e, em seguida adicionou-se as amostras testes (triplicata), colhidas do fluido peritoneal e do homogeneizado da pata. Concentrações decrescentes das citocinas e quimiocinas foram diluídas em PBS-Tween, e utilizadas para a confecção de uma curva padrão. A placa foi novamente coberta e mantida durante 12 horas a 4°C. No terceiro dia, a placa foi lavada por três vezes e adicionados os anticorpos

biotinilados anti-TNF- α , anti-IL-1 β anti MIP-1, anti MIP-2 e anti KC (1:1000 em solução de lavagem contendo 1% de soro de cabra).

Após 1 h de incubação à temperatura ambiente, a placa foi lavada e em seguida adicionou-se 50 μ L de uma solução 1:5000 do conjugado avidina-horseradish peroxidase (DAKO A/S, Denmark) diluída em PBS-T. Após incubação por 30 minutos, a placa foi lavada e incubada com 50 μ L do substrato dihidrocloro 1,2-fenilenodiamina (ortofenileno diamina, OPD, Sigma) diluído em tampão e adicionado com 0,4 μ L de H₂O₂ 30% por mL.

Após o desenvolvimento da cor, a reação foi interrompida pela adição de 75 μ L de solução de H₂SO₄ (1M). A medida da absorbância foi determinada a 490 nm. Os resultados foram expressos em pg/mL de TNF- α , IL-1 β , MIP-1 ou KC com base na curva padrão obtida.

3.5.1.3 *Envolvimento do óxido nítrico no efeito antiinflamatório da lectina de sementes de Lonchocarpus sericeus*

Com o objetivo de se investigar se o óxido nítrico estaria envolvido no efeito inibitório da LSL sobre a migração de neutrófilos foram realizadas as seguintes abordagens experimentais:

3.5.1.3.1 *Dosagem do óxido nítrico (NO) no soro dos animais pré-tratados e.v. com Lectina de sementes de Lonchocarpus sericeus*

Os animais foram tratados e.v. com salina (controle) ou LSL (10 mg/Kg) e 15 minutos após foi administrado Cg i.p. (500 μ g). Quatro horas após a administração da Cg, os animais foram levemente anestesiados com éter, e em seguida amostras de sangue foram coletadas do plexo reto orbital através de capilares de vidro heparinizados. Após separação por centrifugação do sangue (10 min a 600 xg), o soro foi utilizado para a determinação indireta de NO, mensurado pelos níveis de nitrato, os quais foram determinados através da conversão de nitrato (NO₃⁻) a nitrito (NO₂⁻), pela ação da enzima nitrato-redutase e o nitrito quantificado

pela reação de Griess (CHEN *et al.*, 2000). Para o ensaio, 40 μL de soro foram incubados por 12h com 40 μL de tampão contendo a enzima nitrato redutase em placas de 96 poços. Uma curva padrão de nitrato de sódio (0,78-200 μM) também foi processada da mesma forma que foi realizada para as amostras. A dosagem de NO_2^- foi realizada pelo método colorimétrico baseado na reação de Griess. Para tal, foram adicionados 80 μL do reagente de Griess (1% Sulfanilamida em 1% H_3PO_4 / 0,1% de N-1-naftil-etilenodiamina dihidroclorato/ 1% H_3PO_4 / água destilada, 1:1:1:1) em cada poço da placa. Foi determinada a absorbância em leitor de ELISA em 560 nm. A concentração de nitrito foi determinada usando uma curva padrão realizada com NaNO_2 e expressos em μM de NO_2^- .

3.5.1.3.2 Efeito de Inibidores da Síntese de NO sobre a Inibição da migração de neutrófilos pela Lectina de sementes de Lonchocarpus sericeus

Nessa abordagem, 15 min antes da administração e.v. de LSL (10,0 mg/Kg) os animais receberam dois inibidores da NOS: L-Nitro-Arginina metil éster (L-NAME; inibidor inespecífico da NOS) ou Aminoguanidina (Amino; inibidor seletivo da NOS induzida) ambos nas doses de 50 mg/Kg s.c. Após 15 min da administração de LSL a peritonite foi induzida pela injeção i.p. de Cg (500 μg). Para controles experimentais foram formados os seguintes grupos com animais tratados com: salina e.v. e i.p. (controle negativo), com salina e.v. e Cg i.p. (controle positivo), com LSL e.v. e Cg i.p. (controle do efeito da LSL) e com L-NAME ou Amino s.c. e Cg i.p. (controle inibidores). A migração de neutrófilos foi avaliada conforme o item 3.5.1.

3.5.2 Avaliação do efeito da lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* sobre a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por ovalbumina (OVA) em animais pré-imunizados

Para imunizar os camundongos ovalbumina (OVA; 100 μg) foi dissolvida em PBS e adicionada a um volume idêntico de Adjuvante de Freund's completo (CFA). CFA foi usado para aumentar a eficiência do procedimento de imunização (FREUND, 1956) por prolongar o tempo de vida do antígeno administrado e por

estimular uma efetiva ativação direcionada do sistema imune; isto resulta em alterada proliferação e diferenciação leucocitária (BILLIAU; MATTHYS, 2001). Posteriormente, os camundongos foram administrados s.c. (no dorso em dois sítios diferentes) com a emulsão (ovalbumina dissolvida em PBS e adicionada com CFA) no 7º (sétimo) e 14º (décimo quarto) dia. Os animais falsos imunizados foram administrados de forma semelhante com a emulsão sem ovalbumina. Após 21 (vinte e um) dias, os camundongos foram desafiados com ovalbumina por via i.p. (10 µg/cavidade dissolvido em PBS).

No 21º (vigésimo primeiro) dia do processo de imunização, os camundongos foram pré-tratados com salina (controle positivo) ou LSL (3 e 10 mg/kg em 0,1 ml) e.v. 15 minutos antes de receberem ovalbumina (10 µg/cavidade em 0,2 ml). Posteriormente, a migração de neutrófilos foi avaliada 4 horas após a administração de ovalbumina de acordo com o item 3.5.1.. Os animais falsos imunizados receberam ovalbumina (10 µg/cavidade em 0,2 ml) i.p. e os camundongos imunizados também foram desafiados com 0,2 ml de PBS (controles negativos)

3.5.2.1 Elisa para IgG (imunoglobulina G) anti-OVA

Esta abordagem foi realizada para confirmar a eficácia da metodologia realizada para imunização dos animais descrita no item anterior. A eficiência foi comprovada pela presença de IgG anti-Ova nos animais imunizados e a ausência de anticorpos específicos anti-Ova nos animais falso imunizados

Para tanto, uma placa para ELISA com 96 poços (Costar 3590, USA) foi preenchida com 10 µg/ml de ovalbumina diluída e incubada com PBS durante uma noite a 4°C. Posteriormente ligações não específicas foram bloqueadas com BSA (albumina sérica bovina) 1% diluída em PBS por 2 horas a temperatura ambiente, o soro diluído obtido do sangue dos animais imunizados foi adicionado e incubado durante uma noite a 4°C. Após a lavagem com 0.05% Tween 20 diluído em PBS, um anticorpo anti-IgG biotinilado para camundongo foi adicionado e incubado por 1 hora a temperatura ambiente. Os poços foram lavados e avidina-HRP (DAKO A/S,

Denmark; 1:5000) foi adicionada aos poços, após 30 (trinta) minutos os poços foram novamente lavados e receberam o reagente responsável pela coloração o-fenillenodiamina (200 µg/poço). Após 15 minutos a reação foi interrompida por 1M de H₂SO₄. O desenvolvimento da coloração foi mensurado por uma absorbância de 490 nm.

3.5.3 Efeito da lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* sobre a quimiotaxia *in vitro* de neutrófilos

O modelo de quimiotaxia em câmara de Boyden (BOYDEN, 1962) foi utilizado para avaliar se a LSL interage diretamente com neutrófilos *in vitro*. Para tanto, sangue dos camundongos foi coletado por punção cardíaca e colocado em tubos estéreis de 5mL contendo EDTA a 2% e mantidos no gelo. Os polimorfonucleares foram purificados através da utilização de gradiente de Percoll. Em seguida, essas células foram lavadas com solução de Hanks' por 2 vezes. Posteriormente, o sobrenadante foi desprezado e as células resuspendidas em meio RPMI. A contagem total das células foi realizada em câmara de Neubauer, a pureza dos neutrófilos em lâminas pela coloração com Panótico e a viabilidade observada por exclusão em azul de tripan.

Após a separação, 1×10^6 neutrófilos/mL foram ressuspensos em meio RPMI/BSA (0,01%) e pré-incubados por 1 hora (37°C/CO₂ 2%) na presença ou não da LSL (20 e 60µg/mL). Em seguida, os neutrófilos foram lavados 2 vezes com solução de Hanks' e ressuspensos em 1mL com RPMI/BSA (0,01%). O ensaio de quimiotaxia *in vitro* foi realizado em Câmara de Boyden utilizando como estímulo MIP-2 (10^{-7} M), que foi colocada em volume de 28,6 µL/poço no compartimento inferior da câmara. A suspensão de células (10^6 células/mL) previamente tratados com a lectina, foi colocada (50 µL/poço) no compartimento superior. Os dois compartimentos foram separados por uma membrana de policarbonato (5 µm Milipore Corp., Bedford, MA). A câmara foi incubada (37°C/CO₂ 2%) por 1 hora. No final do período de incubação, o filtro foi removido fixado e corado com HEMA. Os neutrófilos que migraram foram quantificados por microscopia óptica usando-se objetiva de imersão (aumento de 100 X).

A contagem foi feita em cinco campos aleatórios, para cada poço, de um total de 6 poços, por grupo experimental. Em cada experimento RPMI foi utilizado como controle negativo (migração randômica) e MIP-2 como controle positivo. A migração foi expressa como o número de neutrófilos por campo.

3.6 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA LECTINA DE SEMENTES DE *Lonchocarpus sericeus* – LSL

Para investigar possíveis efeitos antinociceptivos da LSL, inicialmente utilizamos três modelos experimentais, nos quais a nocicepção induzida por estímulos químicos e térmicos ocorre através de mecanismos centrais e/ou periféricos.

3.6.1 Modelo de nocicepção induzida por ácido acético: contorções abdominais

Camundongos receberam LSL e.v. nas doses de 1, 10 e 100 mg/Kg diluídas em salina. Grupos controles receberam salina e.v. (controle positivo) ou ácido acetilsalisílico (ASS; 250mg/kg) s.c. (controle negativo). Após 15 min dos tratamentos citados, os animais receberam por via i.p. solução de ácido acético 0,6% (10 mL/kg) e após 10 minutos o número total de contorções abdominais foi determinado por um período de 20 minutos (KOSTER *et al.*, 1959). Os resultados foram expressos como as médias do número de contorções \pm erro padrão da média (E.P.M.)

3.6.2 Modelo de nocicepção induzida por formalina

Formalina 1,2% foi administrada na pata traseira direita de camundongos (20 μ L/pata), previamente mantidos em jejum de 12 h. Imediatamente após a administração da formalina o tempo de lambedura (“*licking time*”) foi registrado por cerca de 5 min (fase 1, neurogênica) e de 20 à 25 min (fase 2, inflamatória).

Animais receberam 15 minutos antes da administração da formalina: salina e.v. (controle positivo), sulfato de morfina (5 mg/Kg; controle negativo) e LSL na dose de 10 mg/Kg e.v. diluídas em salina. Os resultados foram expressos como o tempo de lambertura em segundos \pm E.P.M (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

3.6.3 Modelo de nocicepção induzida por elevação da temperatura: Teste da Placa quente

O método da placa quente consiste em colocar camundongos sobre uma placa aquecida ($51\pm 1^\circ\text{C}$) e observar quanto tempo que os animais levam para manifestar uma resposta, que corresponde ao ato de saltar e/ou lambem a pata traseira. Sendo este um teste específico de nocicepção de resposta central.

Os animais que apresentaram reações ao estímulo térmico, em um intervalo de tempo de até 20 segundos foram selecionados para o teste. Nesse modelo, camundongos receberam salina e.v. (controle positivo), sulfato de morfina (5 mg/Kg) s.c. (controle negativo), sulfato de morfina (5 mg/Kg) em adição com naloxona (2mg/kg) s.c. e LSL nas doses de 10 mg/Kg e.v. no tempo zero (T0), respectivamente. Após 15 min, o tempo de resposta foi avaliado nos tempos de 30(T30), 60(T60), 90(T90), min, com um tempo de corte ("cut-off") de 45 segundos para evitar lesão na pata do animal. Os resultados foram expressos como o tempo de reação em segundos \pm E.P.M (EDDY; LEIMBACH, 1953).

3.6.4 Modelo de hipernocicepção mecânica induzida por carragenina e prostaglandina E₂ (PGE₂)

Quando comparado com os testes de nocicepção induzida por agentes químicos, os testes mecânicos apresentam uma importante vantagem, pois permitem uma dissociação entre a sensibilização dos nociceptores (pela injeção de um flogógeno ou de um mediador inflamatório específico, como uma citocina) e um comportamento nociceptivo espontâneo (nocicepção manifesta), induzida por um estímulo químico (LE BARS *et al.*, 2001).

As respostas comportamentais para o estímulo mecânico foram realizadas utilizando filamentos de Von Frey (diâmetro 0,8 mm). Os camundongos foram colocados em uma caixa plástica elevada com uma trama de arame no soalho. Os filamentos de Von Frey foram aplicados embaixo da superfície plantar da pata traseira direita em ordem ascendente de estímulo de força até um valor máximo de 50g (para evitar lesão na pata). No limiar, o camundongo retirava a pata fora do filamento. A pata traseira direita foi testada 3 (três) vezes, o intervalo entre dois testes consecutivos na mesma pata foi de até 1 (um) minuto. Os resultados foram apresentados como a média das respostas contra um dado estímulo de força.

A hipernocicepção foi mensurada como sendo a diferença obtida entre o tempo 0 (zero) e 3 (três) horas após a administração intraplantar de carragenina (100µg/pata; 0,25 ml) ou PGE₂ (100 ng/pata; 0,25ml) em camundongos pré-tratados e.v. com LSL (3 e 10 mg/kg) ou salina (controle positivo) 15 minutos antes da administração destes agentes flogísticos. As doses injetadas de carragenina e PGE₂ foram as menores doses que induziram hipernocicepção mecânica aguda máxima (FERREIRA *et al.*, 1978a, 1978b; 1988; CUNHA *et al.*, 1992).

3.6.4.1 *Efeito da lectina de sementes de Lonchocarpus sericeus sobre a migração de neutrófilos na hipernocicepção induzida por carragenina*

Com o objetivo de investigar se o efeito antinociceptivo da LSL na hipernocicepção induzida por Cg ocorria por inibição da migração de neutrófilos, esta foi medida indiretamente pela quantificação da atividade da mieloperoxidase (MPO) nas patas dos animais por um ensaio cinético-colorimétrico descrito por Souza *et al.* (1994) com algumas alterações. Os camundongos receberam 15 min antes da carragenina intraplantar (100 ng/pata, s.c.): salina e.v. (controle positivo) e LSL (3 e 10mg/kg; e.v.). O controle negativo recebeu salina s.c.

Após 3 horas da administração intraplantar da Cg amostras do tecido das patas dos animais foram coletadas, pesadas e trituradas em Politron Ultra-Max em solução (NaCl, NaPO₄, NaEDTA), sob condições adequadas de refrigeração. A seguir, foram centrifugadas a 13.000 g durante 15 minutos a 4°C. O pellet obtido foi ressuspensionado na mesma solução tampão e novamente centrifugado. O novo pellet

obtido foi ressuspendido em uma segunda solução tampão (NaPO_4 e H-TBA), re-homogenizado, congelado e descongelado e centrifugado a 4°C , durante 15 minutos, com frequência de 10.000 a 20.000 rpm. O sobrenadante foi colhido e devidamente armazenado para posterior ensaio da mielopredoxidase, utilizando placa de 96 poços e leitura da densidade óptica a 450 nm espectrofotômetro.

A atividade de MPO foi comparada a uma curva padrão de neutrófilos de camundongos processado da mesma maneira. Os resultados foram apresentados como a atividade de MPO (número de neutrófilos/mg de tecido).

3.6.4.2 *Efeito da lectina de sementes de Lonchocarpus sericeus sobre a liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas na hipernocicepção induzida por carragenina*

As concentrações das citocinas ($\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$) e das quimiocinas (MIP-1/CCL3), (MIP-2/CXCL2) e (KC/CXCL1) foram determinadas por *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) em amostras de tecidos das patas dos animais pré-tratados com salina e LSL (3 e 10mg/Kg) e.v. 15 min antes da administração da Cg i.pl. (100ng/pata). Grupo controle negativo recebeu somente salina i.p. Duas horas após a injeção da Cg as patas foram removidas e dissecadas, posteriormente, o tecido foi homogeneizado em 500 μl de tampão contendo inibidores de proteases, centrifugado e o sobrenadante armazenado a -70°C para posterior dosagem das citocinas e quimiocinas como descrito no item 3.5.1.2.

3.6.5 **Modelo de hipernocicepção mecânica induzida por OVA em animais pré-imunizados**

No 21^o (vigésimo primeiro), último dia do processo de imunização conforme descrito no item 3.5.2. a hipernocicepção foi mensurada após 3 horas da administração de ovalbumina de acordo com o item 3.6.4. Nos tempos 0 (zero) e 3 (três) horas após administração s.c. intraplantar de ovalbumina (3 μg /pata em 0,25 ml) em camundongos pré-tratados com salina (controle positivo) ou LSL (3 e 10

mg/kg). O veículo (PBS) também foi injetado intraplantar (s.c.) e os camundongos falsos imunizados foram desafiados com OVA (controles negativos).

3.7 AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS EFEITOS DA LECTINA DE SEMENTES DE *Lonchocarpus sericeus* SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL: MODELOS DE COMPORTAMENTO ANIMAL

3.7.1 Avaliação da atividade motora

3.7.1.1 Teste do rota rod

Esta abordagem foi feita com o objetivo de verificar uma possível interferência da LSL na coordenação motora do animal. Para tanto, os animais foram pré-selecionados 24 horas antes da realização do experimento, ao serem individualmente posicionados no aparelho de rota rod (4 rotações por minuto). O animal que permaneceu 2 minutos na barra foi selecionado para estudo.

Os animais receberam LSL e.v. na dose de 10 mg/Kg ou salina (grupo controle). Diazepam (2 mg/Kg; s.c.) foi utilizado como controle negativo no experimento. Após 30 min das injeções, os animais foram colocados na barra, individualmente, e registrado o tempo de permanência no aparelho durante 2 min. Os resultados foram expressos como o tempo (em segundos) de permanência do animal no aparelho \pm E.P.M. (DUNHAM; MYIA, 1957).

3.7.1.2 Teste do campo aberto

A atividade motora (locomação espontânea) dos animais foi verificada por meio de um campo aberto quadrangular, com 30 cm de lado, tendo demarcado em sua base 9 quadrados iguais com 10 cm de lado cada um. Os camundongos foram divididos em dois grupos: O grupo controle (tratado com salina e.v.) e o grupo tratado com LSL (10 mg/kg). Após 30 minutos do tratamento, os animais foram levados individualmente para o campo aberto, ambientados por 1 minuto e, em

seguida, observados por 4 minutos quanto ao número de campos explorados (CAPAZ *et al.*, 1981).

3.7.2 Avaliação da atividade depressora: Teste do nado forçado

No sentido de avaliar se a LSL exerce atividade depressora central, o nado forçado foi imposto em camundongos tratados com salina ou LSL (10 mg/kg). Este nado foi individualmente imposto por 6 minutos, sendo 1 minuto de ambientação. Estes animais foram colocados individualmente em um recipiente de acrílico transparente com 21 cm de diâmetro na base e 30 cm na parte superior, contendo água a 26° C, em quantidade suficiente para se ter 12 cm de profundidade. Definiu-se como imobilidade do nado forçado o período em que o animal cessava seus movimentos, permanecendo em postura semiverticalizada, com apoio na ponta de uma das patas posteriores no fundo, ou em flutuação, mantendo apoio de uma ou ambas as patas superiores na parede do recipiente e a cabeça verticalizada acima da superfície da água. Os movimentos rápidos de correção postural após a perda lenta e progressiva do equilíbrio, observados após instalado um episódio de imobilidade, não foram considerados como finalizações. Estas correções posturais foram estipuladas como sendo a procura de novas posturas. A água foi renovada e a temperatura corrigida com adição de água fria ou quente antes do teste de cada animal. A soma cumulativa das durações dos episódios de imobilidade durante o período de 5 minutos de natação forçada foi obtida em cronômetro manual (DETKE *et al.*, 1997; LUCKI, 1997).

3.8 TOXICIDADE AGUDA

Para avaliação de possíveis efeitos tóxicos da LSL, foram utilizados dois grupos experimentais. Um grupo recebeu uma solução de lectina (10mg/kg) diluída em solução salina durante sete dias por via e.v., obedecendo uma posologia de tomada diária única. O outro grupo recebeu a mesma quantidade de solução salina pela mesma via e posologia.

Após os sete dias, os animais foram pesados e sua massa comparada com o massa anterior (antes do tratamento) e o resultado sendo expresso como variação de massa corpórea antes e após os tratamentos. Em seguida, foi coletado sangue dos animais de ambos os grupos pelo plexo orbital para avaliação do leucograma e dosagens bioquímicas, sendo estes então sacrificados, e seus órgãos (fígado, coração, rim) removidos ainda úmidos e pesados. O peso de cada órgão foi expresso por cada 100g de massa corporal e comparado ao grupo controle. O estômago dos animais foi também removido para avaliação macroscópica da possível presença de úlceras (SANTUCCI *et al.*, 1994).

Na avaliação do leucograma, uma gota de sangue foi colocada sobre lâminas para a confecção de esfregaços, corados pelo método HE, e destinados à contagem diferencial das células em microscópio óptico, utilizando a objetiva de imersão (aumento de 100 vezes). A contagem total foi feita de acordo com o método de Souza e Ferreira (1985). Após este procedimento, obteve-se então o número de células $\times 10^3$ / mL de sangue.

O restante da amostra de sangue foi centrifugado, e o plasma removido para realização das dosagens bioquímicas de uréia como indicador de função renal e avaliação da atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), como indicadores da função hepática. Todas as dosagens foram realizadas utilizando “Kits” específicos em aparelhos automatizados pelo laboratório de Bioquímica do Hospital Universitário Walter Cantídio da UFC.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. (Erro Padrão da Média). Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos foi realizada Análise de Variância (ANOVA) e teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Além do teste-t Student para o restante das comparações. Para todas as análises foi considerado significativo $p < 0,05$.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA

4.1.1 Lectina de *Lonchocarpus sericeus* reduz a migração de neutrófilos induzida por carragenina em camundongos

Quatro horas após a administração i.p. de Carragenina (500µg/cavidade) ocorreu intensa e significativa ($p < 0,05$) migração de neutrófilos para cavidade peritoneal dos animais ($10,37 \pm 1,26 \times 10^{-6}$ neutrófilos/cavidade), quando comparados aos animais controle (salina; i.p.) ($0,31 \pm 0,02$ neutrófilos/cavidade). O tratamento e.v. com LSL (3 e 10mg/kg), 15 min antes do estímulo inflamatório (carragenina), reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) a migração de neutrófilos para valores de $3,02 \pm 0,18 \times 10^{-6}$ neutrófilos/cavidade e $1,06 \pm 0,38 \times 10^{-6}$ neutrófilos/cavidade, respectivamente (inibição de 70,1 e 89,9%, respectivamente) (Figura 2)

4.1.2 Lectina de *Lonchocarpus sericeus* inibe o rolamento e a adesão dos leucócitos no endotélio vascular de animais estimulados com carragenina.

A administração de carragenina (500 µg/cavidade) i.p. induziu um aumento significativo do rolamento ($59,6 \pm 25,5$ leucócitos/min) e adesão ($1,21 \pm 0,4$ leucócitos aderidos/100mm²) de leucócitos no endotélio (vênulas mesentéricas pós-capilares; *in vivo*) quando comparado ao grupo controle que recebeu apenas salina i.p. (rolamento: $18,5 \pm 2,5$ leucócitos/min; adesão: $0,23 \pm 0,05$ leucócitos aderidos/100mm²). O tratamento e.v. com LSL (10mg/kg), 15 min antes dos animais receberem o estímulo inflamatório (carragenina), produziu redução significativa do rolamento ($9,44 \pm 1,05$ leucócitos/min; inibição de 84,2%) e adesão ($0,59 \pm 0,03$ leucócitos aderidos/100mm²; inibição de 50,8%) de leucócitos ao endotélio. Salina ou LSL (10 mg/kg) foram administradas i.p. sozinhas e utilizadas como controle. (Figura 3 painel A e B).

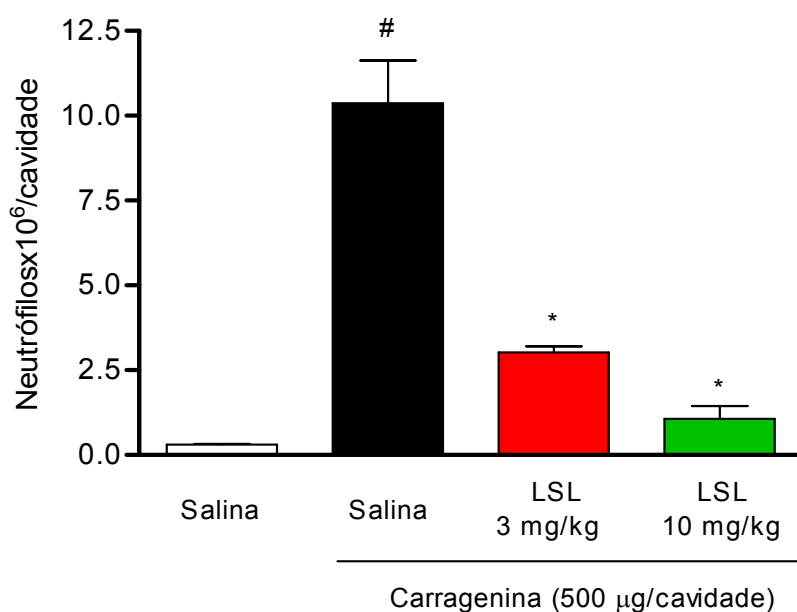


Figura 2 – Lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (LSL) inibe a migração neutrofílica (MN) induzida por carragenina (Cg) para a cavidade peritoneal de camundongos. Os animais foram tratados e.v. com salina (0,1 mL), ou LSL (3 ou 10 mg/kg) 15 min. antes de receberem Cg i.p. (500 µg/cavidade). A MN foi avaliada 4h depois. Os animais controle negativo representam a MN induzida por salina i.p. Os valores são representados pela média \pm E.P.M. do n. de neutrófilos (n=6). * indica significância estatística ($p < 0.05$) comparado ao grupo Carragenina e # comparado ao grupo salina (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

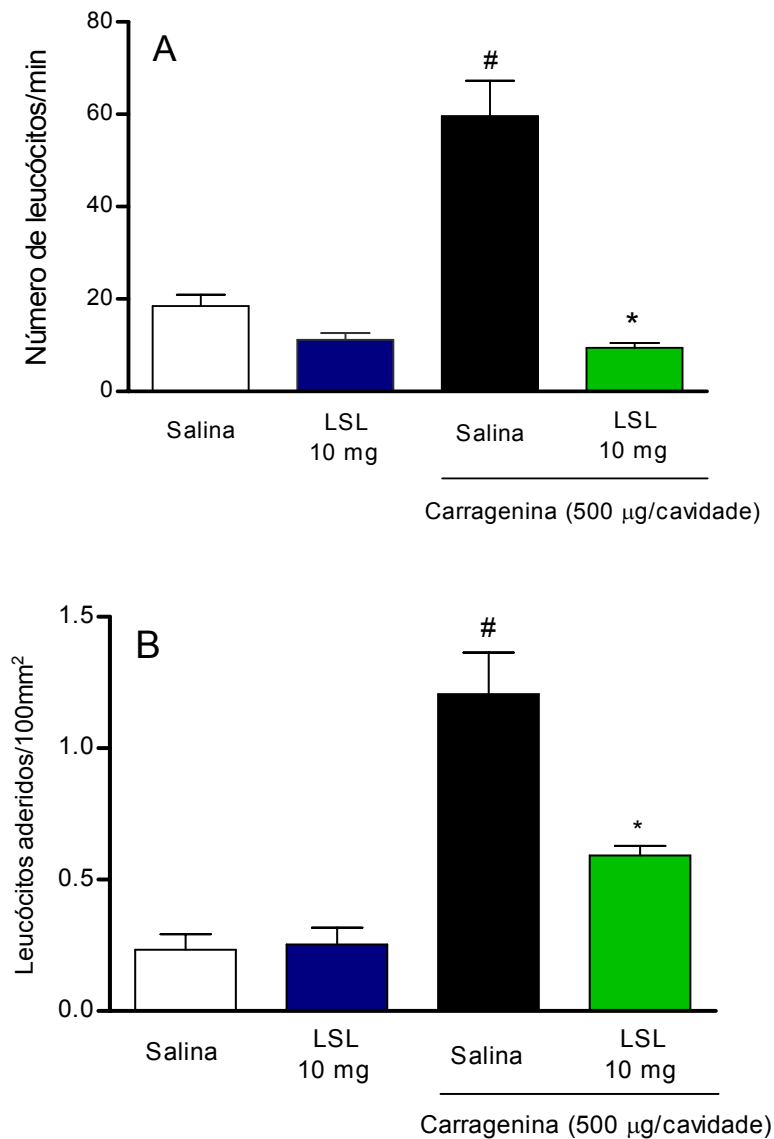


Figura 3 – Lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (LSL) diminui a adesão e o rolamento de leucócitos nas células endoteliais. Os animais foram tratados e.v. com salina (0.1 mL) ou LSL (10 mg/kg), 15 min. antes de Cg i.p. O rolamento (Painel A) e a adesão (Painel B) de leucócitos foram avaliados por microscopia intravital mesentérica após 2 h da administração da Cg. Os animais controles foram administrados somente com salina ou LSL (10 mg/kg) i.p. Os resultados expressos como média \pm E.P.M. do n. de leucócitos/ min (painel A) e do n. de leucócitos aderidos/100mm².(painel B) (n=6).* indica significância estatística (p<0.05) comparado ao grupo Carragenina e [#] comparado ao grupo salina (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

4.1.3 Lectina de *Lonchocarpus sericeus* reduz os níveis de citocinas (TNF- α e IL-1 β) no exsudato peritoneal de camundongos estimulados com carragenina.

A administração intraperitoneal de carragenina (500 μ g/cavidade) induziu um significativo ($p < 0,05$) aumento nos níveis de TNF- α (161,7 \pm 34,0 pg/mL; painel A) e IL-1 β (440,2 \pm 73,4 pg/mL; painel B) no exsudato peritoneal dos animais após 2 horas do tratamento (Figura – 4). O pré-tratamento e.v. com LSL (3 ou 10 mg/kg), 15 min antes dos animais receberem carragenina i.p. reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) os níveis de TNF- α para valores de 114,1 \pm 6,96 pg/mL e 94,90 \pm 3,86 pg/mL, respectivamente (inibição de 29,1 e 41,3%, respectivamente) (figura 4 - painel A). O mesmo pré-tratamento com LSL (3 ou 10 mg/kg) também reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) os níveis de IL-1 β para valores de 210 \pm 10,7 pg/mL e 183 \pm 8,99 pg/mL, respectivamente (inibição de 52,3 e 58,4%, respectivamente) (Figura 4 - painel B).

4.1.4 Lectina de *Lonchocarpus sericeus* reduz os níveis de quimiocinas (MIP-1, KC) no exsudato peritoneal de camundongos estimulados com carragenina.

A administração intraperitoneal de carragenina (500 μ g/cavidade) induziu um significativo ($p < 0,05$) aumento nos níveis de quimiocinas CCL3/MIP-1 (450,2 \pm 154,5 pg/mL; painel A), CXCL1/KC (600,9 \pm 146,3 pg/mL; painel B) e CXCL2/MIP-2 (669,6 \pm 96,5 pg/mL; painel C) no exsudato peritoneal dos animais após 2 horas de tratamento (Fig 5). O pré-tratamento e.v. com LSL (10 mg/kg) 15 min antes dos animais receberem carragenina i.p. reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) os níveis de MIP-1 para um valor de 134 \pm 13,11 pg/mL (inibição de 70,2%) (Figura 5 - painel A), e os níveis de KC para um valor de 344,4 \pm 12,75 pg/mL (inibição de 42,7%) (Figura 5 - painel B). Os níveis de MIP-2 não foram reduzidos de forma significativa após tratamento com LSL em nenhuma das doses usadas (Figura 5 - painel C).

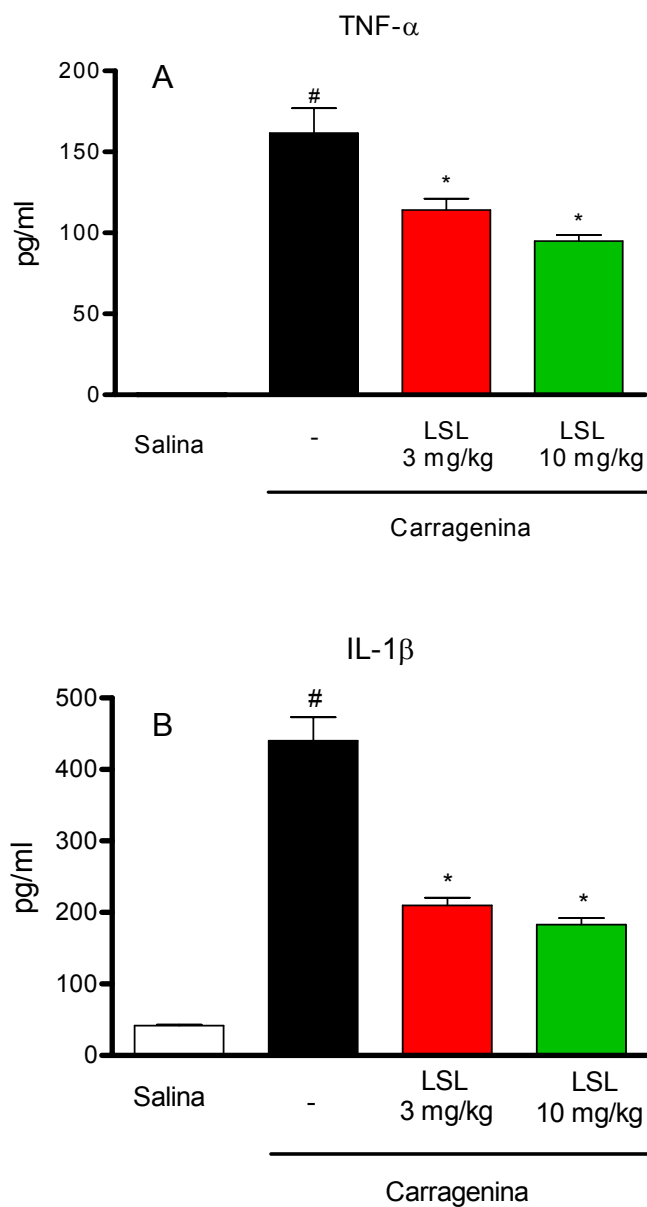


Figura 4 – Lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (LSL) reduz os níveis de citocinas (TNF- α e IL-1 β) no exsudato peritoneal em camundongos estimulados com carragenina. PAINEL A – níveis de TNF- α . PAINEL B – níveis de IL-1 β . Os animais receberam e.v. salina (controle) ou LSL (3 ou 10 mg/kg) 15 minutos antes da Cg i.p. (500 μ g/cavidade). Os animais controle receberam apenas salina i.p. A concentração de citocinas foi determinada por ELISA. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. de pg de citocina/mL de fluido peritoneal (n=5). * indica significância estatística (p<0.05) comparado ao grupo Cg e [#] comparado ao grupo salina (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

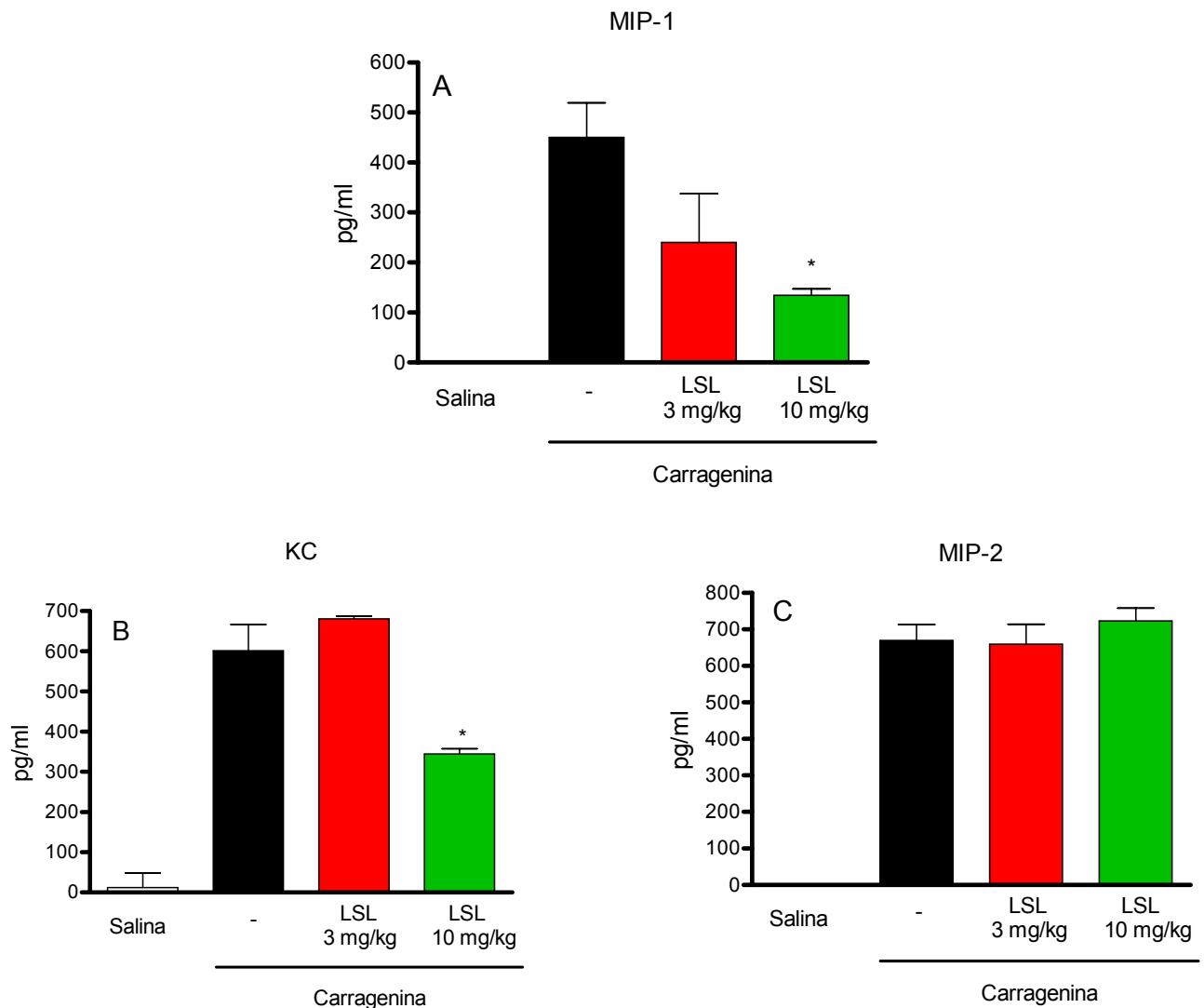


Figura 5 – Lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (LSL) reduz os níveis de quimiocinas (MIP-1 e KC) no exsudato peritoneal em camundongos estimulados com carragenina. PAINEL A – níveis de MIP-1. PAINEL B – níveis de KC. PAINEL C – níveis de MIP-2. Os animais receberam salina (controle) ou LSL (3 ou 10 mg/kg) e.v. 15 minutos antes de Cg i.p. (500µg/cavidade). Os animais controle receberam apenas salina i.p. A concentração das quimiocinas foi determinada por ELISA. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. de pg de quimiocina/mL de fluido peritoneal (n=5). * indica significância estatística ($p < 0.05$) comparado ao grupo Carragenina. (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

4.1.5 O tratamento e.v. com a lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* induz aumento nos níveis sanguíneos de óxido nítrico (NO).

A lectina de *Lonchocarpus sericeus* induziu um aumento significativo (cerca de quatro vezes mais) nos níveis de nitrito em soro de animais com peritonite induzida por Cg ($86,4 \pm 16,8$ mM de NO_3). O grupo que recebeu somente salina apresentou baixos níveis de nitrito no soro ($21,53 \pm 3,2$ mM de NO_3). A administração de carragenina não modificou os níveis de nitrito ($13,17 \pm 2,1$ mM de NO_3) em relação ao grupo tratado com salina (Figura 6).

4.1.6 Inibidor específico da iNOS inibe a atividade antiinflamatória da lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* na peritonite induzida por carragenina

Aminoguanidina, um inibidor específico da iNOS, foi capaz de reduzir de forma significativa ($5,98 \pm 0,54$ neutrófilos/cavidade), o efeito inibitório da LSL sobre a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida pela Cg, quando comparada ao grupo que recebeu a lectina sem um inibidores da síntese de NO ($0,78 \pm 0,09$ neutrófilos/cavidade). Tanto aminoguanidina quanto L-nitro-arginina metil éster quando administradas sozinhas, não modificaram a migração de neutrófilos induzida pela carragenina (Figura 7).

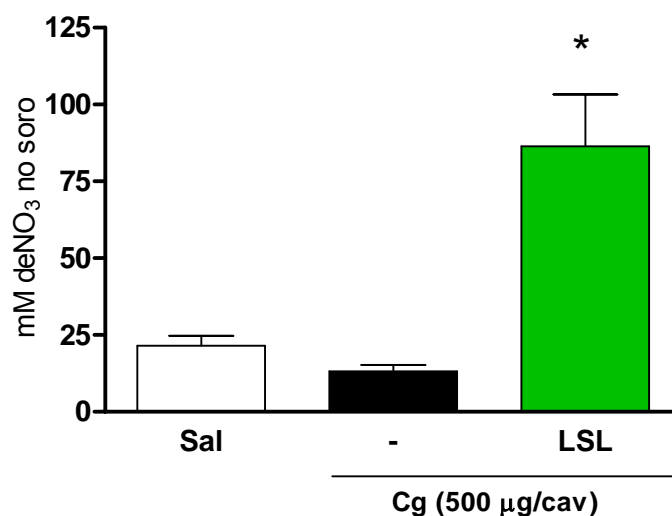


Figura 6 – Lectina de *Lonchocarpus sericeus* (LSL) induz aumento de NO no sangue de camundongos. Os animais foram tratados e.v. com LSL (10 mg/Kg) ou salina (controle positivo) 15 min antes da Cg i.p. (500 µg/cav.). O controle negativo (Sal) recebeu somente salina i.p. Após 4 horas da Cg, o soro dos animais foi coletado para dosagem de nitrito através da reação de Griess. As barras representam a média ± E.P.M. da concentração de nitrito em µM. * p<0,05 comparado com o grupo Salina e Cg (n=6) (ANOVA, teste de Bonferroni).

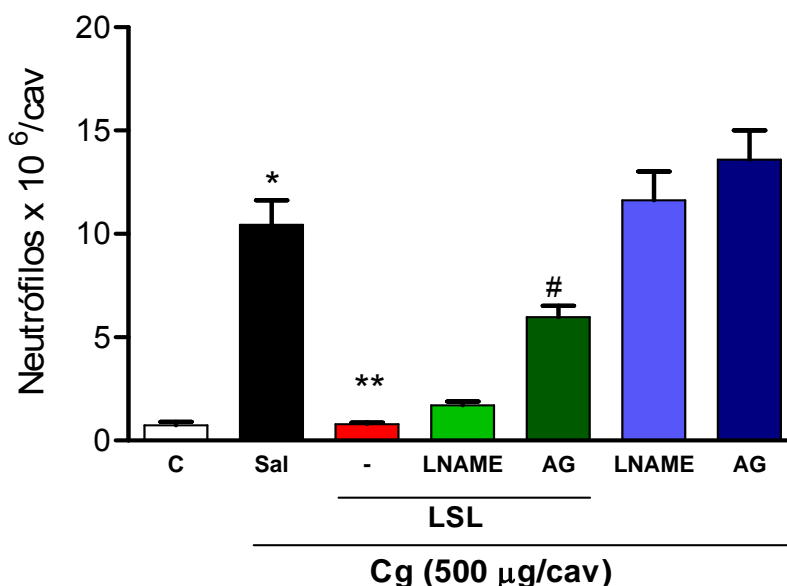


Figura 7 – Aminoguanidina diminui o efeito antiinflamatório da lectina de *Lonchocarpus sericeus* (LSL) no modelo de peritonite induzida por Cg. Os animais foram tratados s.c. com salina (-), L-Nitro-Arginina (50 mg/Kg; L-Nitro) ou Aminoguanidina (50 mg/Kg; Amino) 15 min antes de LSL (10 mg/Kg e.v.). Após 15 min da injeção de LSL, Cg (500 µg/cav.) foi administrada i.p. O controle negativo (C) recebeu salina i.p. O grupo controle positivo recebeu salina e.v. e Cg i.p. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após a Cg. Grupos controles adicionais foram realizados com a administração de L-Nitro-Arginina ou Aminoguanidina 15 min antes da administração i.p. de Cg. As barras representam a média ± E.P.M. do n. de neutrófilos. * p<0,05 indica diferença significativa comparado ao grupo C, ** comparado ao grupo Cg(Sal) e # ao grupo tratado somente com LSL (n=6). (ANOVA, teste de Bonferroni)

4.1.7 Lectina de *Lonchocarpus sericeus* reduz a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por OVA em camundongos imunizados.

Através de ELISA foi mensurado a produção de IgG específica anti-OVA (figura 8 painel A) e confirmando a eficácia da metodologia de imunização dos camundongos (presença de IgG anti-Ova) nos animais imunizados e a ausência de anticorpos específicos anti-Ova nos animais falso imunizados. No painel B da figura 8, após a administração de OVA (10 μ g/cavidade; i.p.) nos camundongos imunizados, foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal destes animais ($9,4 \pm 1,7 \times 10^{-6}$ neutrófilos/cavidade), quando comparado com os animais falso imunizados ($1,46 \pm 1,01$ neutrófilos/cavidade). O tratamento e.v. com LSL (3 e 10mg/kg), 15 min antes de receberem o estímulo inflamatório (OVA) reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) a migração de neutrófilos de maneira dose-dependente para valores de $1,01 \pm 0,45 \times 10^{-6}$ neutrófilos/cavidade e $0,63 \pm 0,09 \times 10^{-6}$ neutrófilos/cavidade, respectivamente (redução de 89,2 e 93,3%, respectivamente).

4.1.8 Lectina de *Lonchocarpus sericeus* não interfere na quimiotaxia induzida por MIP-2 in vitro

A migração in vitro em câmara de Boyden utilizando MIP-2 como agente quimioatrator direto, demonstrou que LSL (20 e 60 μ g/ml) não inibiu a quimiotaxia direta de neutrófilos ($20,33 \pm 0,62$ neutrófilos/campo e $19,17 \pm 0,68$ neutrófilos/campo, respectivamente) quando comparado ao grupo controle positivo de neutrófilos atraídos por MIP-2 sem a presença da lectina ($19,0 \pm 0,63$ neutrófilos/campo). Adicionalmente o controle negativo (RPMI) não provocou significativa migração de neutrófilos ($6,03 \pm 0,42$ neutrófilos/campo) (figura 9)

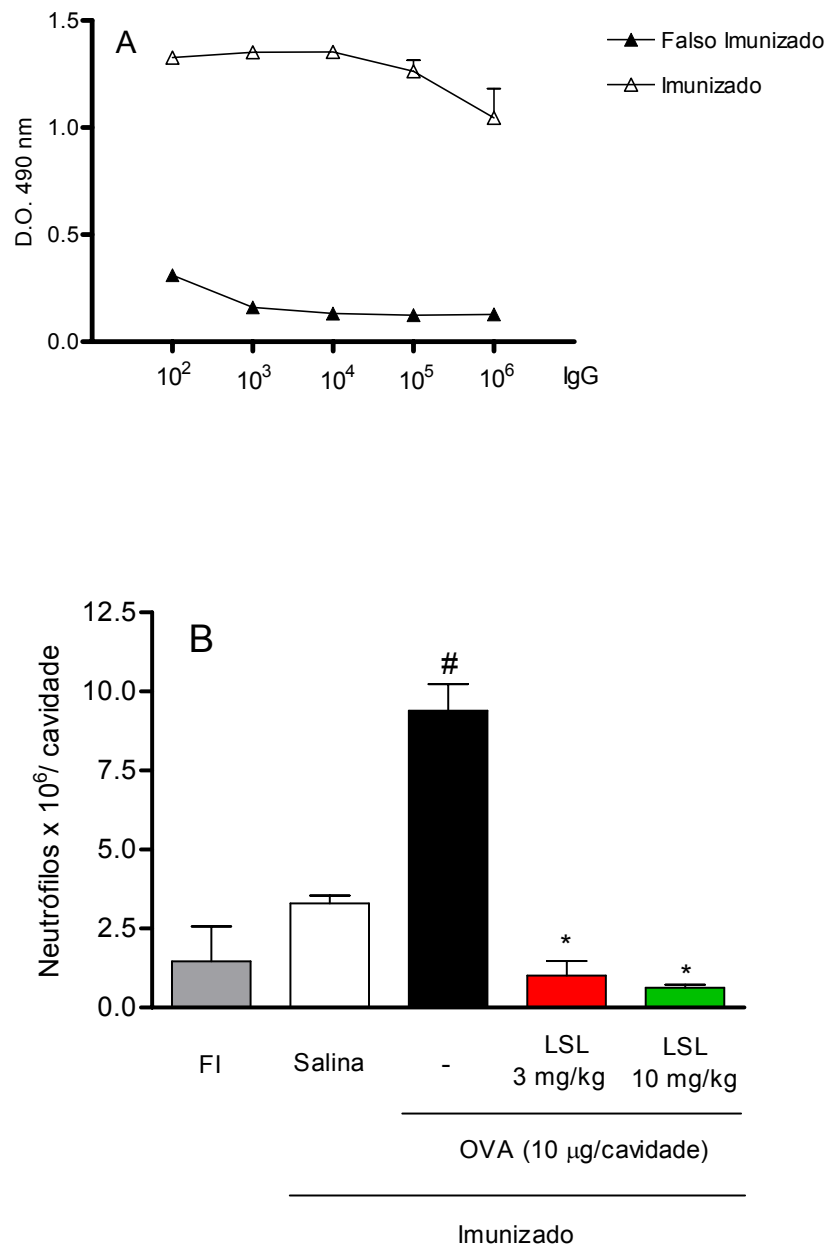


Figura 8 – Lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (LSL) reduz migração de neutrófilos (MN) induzida por ovoalbumina (OVA) em camundongos imunizados. PAINEL A – A titulação da cinética da IgG específica anti-OVA foi acompanhado em camundongos imunizados (Δ) e falso-imunizados (\blacktriangle) por ELISA. **PAINEL B** – Os camundongos imunizados foram tratados e.v. com salina ou LSL (3 ou 10 mg/kg) 15 min antes de receberem OVA (10 μ g/cavidade i.p.). Nos controles, os animais falso-imunizados (FI) também foram desafiados com OVA (10 μ g/cavidade i.p.) e os animais imunizados também receberam salina. A MN foi determinada 4 h após a OVA. Os resultados são expressos com média \pm E.P.M. do n. de neutrófilos/cav (n=6). * indica significância estatística ($p < 0.05$) comparado ao grupo imunizado e administrado com OVA; # comparado ao grupo salina (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

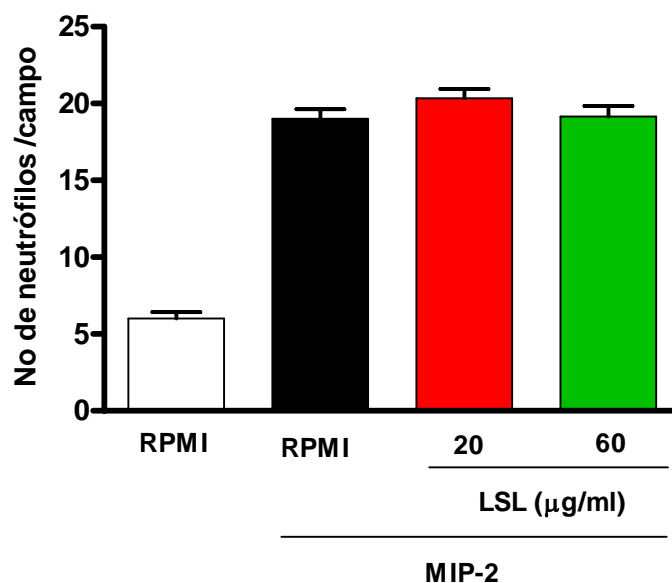


Figura 9 – Lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (LSL) não inibe quimiotaxia de neutrófilos induzida por MIP-2 *in vitro*. MIP-2 (10^{-7} M), foi utilizado como agente quimiotático direto em microcâmaras. Os grupos tratados receberam LSL (20 e 60 $\mu\text{g/ml}$) nas microcâmaras. O grupo controle foi estimulado com RPMI. Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M. do número de neutrófilos por campos de um total de cinco campos por poço (6 poços por grupo). * $p < 0,05$ comparado ao grupo RPMI. ANOVA – Bonferroni

4.2 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIINOCICEPTIVA

4.2.1 Lectina de *Lonchocarpus sericeus* reduz a frequência de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.

O ácido acético (0,6%) administrado por via intraperitoneal produziu um certo número de contorções abdominais nos camundongos ($18,9 \pm 1,2$ contorções/20 min). A lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (LSL) foi administrada por via i.v. nas doses de 1; 10 e 100 mg/kg; as doses de 10 e 100 mg/kg reduziram de forma significativa ($p < 0,05$) o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético para valores de $6,4 \pm 2,0$ e $2,2 \pm 0,97$ contorções/20 min (inibição de 66,1 e 87,8% respectivamente). O controle foi realizado com o ácido acetilsalicílico (AAS) no qual reduziu o número de contorções abdominais em $9,7 \pm 2,1$ contorções/20min (inibição de 49%) (figura 10).

4.2.2 Lectina de *Lonchocarpus sericeus* apresenta atividade antinociceptiva somente na fase inflamatória do teste da formalina

Formalina (1,2%) administrada por via intraplantar produziu um aumento no tempo de lambedura da pata tanto na primeira (0-5 min; neurogênica) quanto na segunda fase (20-25 min; inflamatória), esses valores foram de $73,6 \pm 8,0$ segundos e $45,6 \pm 8,1$ segundos, respectivamente. A lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (LSL) administrada por via i.v. na dose de 10 mg/kg reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) o tempo de lambedura da pata somente na segunda fase (inflamatória) para um valor de $3,57 \pm 2,6$ segundos (inibição de 92%). Morfina (morf.) foi utilizada como droga controle e reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) o tempo de lambedura na primeira ($19,43 \pm 3,35$, inibição de 74%) e segunda fase ($0,85 \pm 0,46$, inibição de 98%) do teste (figura 11).

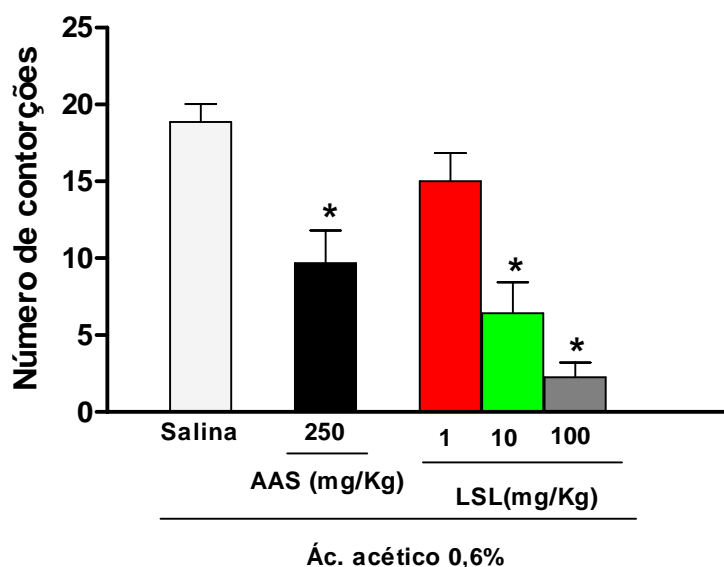


Figura 10 – Lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (LSL) reduz o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. A nocicepção foi mensurada imediatamente após injeção de ácido acético (AC;0,6%) na cavidade peritoneal dos camundongos. Ácido acetilsalicílico (ASS 250 mg/Kg; s.c.) ou LSL (1, 10 e 100 mg/kg; i.v.) foram administrados 15 min. antes do AC. O grupo controle (salina) recebeu apenas AC. Os resultados são expressos com media \pm E.P.M. do n. de contorções abdominais (n=8). * indica significância estatística (p<0.05) comparado ao grupo controle (salina); (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

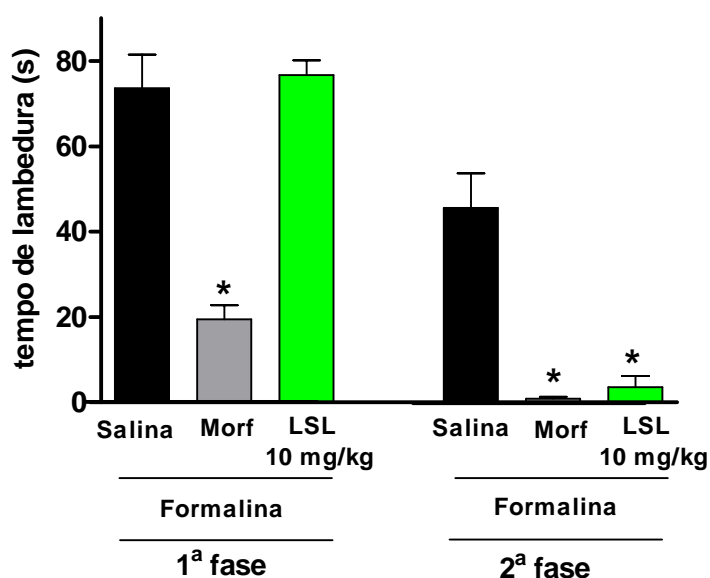


Figura 11 – Lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (LSL) inibe a segunda fase do teste de formalina em camundongos. A nocicepção foi mensurada imediatamente após injeção intraplantar de formalina (1,2%) nos tempos de 0-5 min (fase neurogênica) e 25-30 min (fase inflamatória). Morfina (Morf 5 mg/Kg; s.c.) ou LSL (10 mg/kg; i.v.) foram administrados 15 min. antes da formalina. O grupo controle (salina) recebeu apenas formalina. Os resultados são expressos com media \pm E.P.M. do tempo de lambedura (s) (n=8). * indica significância estatística (p<0.05) comparado ao grupo controle (salina); (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

4.2.3 Lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* não interfere no tempo de reação dos camundongos no modelo da placa quente

A placa aquecida a $51 \pm 0,5$ °C produziu durante a avaliação (30; 60 e 90 minutos) um tempo de reação nos camundongos de $17,8 \pm 3,7$; $18,8 \pm 6,9$ e $20,1 \pm 9,4$ segundos, respectivamente. A lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (LSL) administrada por via e.v. na dose de 10 mg/kg não aumentou de forma significativa ($p < 0,05$) o tempo de latência dos camundongos na placa em nenhum dos tempos avaliados. Morfina (agonista dos receptores opióides) foi utilizada como droga controle e aumentou a latência dos animais na placa durante os tempos de 30 e 60 minutos ($38,5 \pm 10,1$ e $34,3 \pm 11,3$, respectivamente). A Naloxona (antagonista dos receptores opióides) quando combinada com a morfina inibiu significativamente ($p < 0,05$) o aumento de tempo de latência na placa induzido pela morfina nos tempos de 30 e 60 minutos ($23,6 \pm 6,8$ e $23,1 \pm 7,8$ segundos, respectivamente) (figura 12).

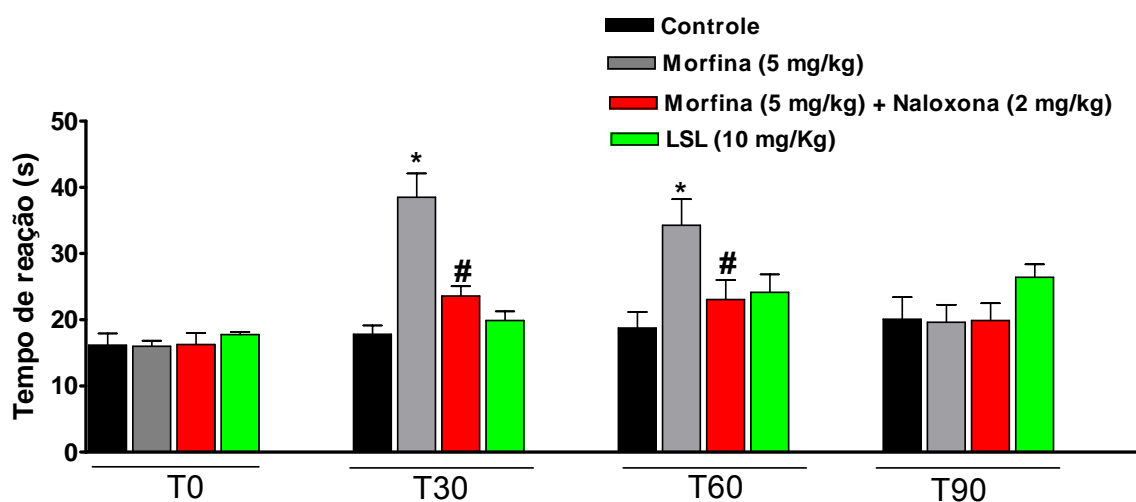


Figura 12 – Lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (LSL) não apresenta efeito no teste da placa quente em camundongos. A nocicepção (tempo de reação) foi mensurada imediatamente após o aquecimento da placa em 51°C. Morfina (Morf 5 mg/Kg; s.c.) sozinha ou com naloxona (Nalox. 2 mg/Kg; s.c.) e LSL (10 mg/kg; i.v.) foram administrados 15 min. antes dos animais serem colocados sobre a placa aquecida. O grupo controle foi colocado sobre a placa aquecida sem receber nenhum tratamento. Os resultados são expressos com média \pm E.P.M. do tempo de reação (s) (n=8). A mensuração ocorreu durante os tempos de 0, 30, 60 e 90 min. * indica significância estatística ($p < 0.05$) comparado ao grupo controle; # comparado ao grupo morfina (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

4.2.4 Lectina de *Lonchocarpus sericeus* reduz a hipernocicepção mecânica induzida por carragenina em camundongos, mas não por Prostaglandina E₂ (PGE₂)

A administração s.c de carragenina (100 µg/pata; s.c.) e PGE2 (100 ng/pata) na pata traseira direita dos camundongos promoveu um significativo efeito nociceptivo ($p < 0.05$) quando comparado aos animais que receberam apenas salina por via intraplantar. Este efeito foi observado pelo aumento da diferença do limiar de retirada ($6,19 \pm 0,55$ g) e ($3,38 \pm 1,43$ g) nos animais tratados com Cg e PGE2, respectivamente, em relação ao grupo tratado somente com salina (controle). O pré-tratamento e.v. com a lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (LSL) nas doses de 3 e 10 mg/kg, 15 min antes da administração de carragenina, inibiu de forma dose dependente a hipernocicepção mecânica induzida pela Cg para valores de $3,75 \pm 0,66$ g e $1,75 \pm 0,58$ g respectivamente (inibição de 39,4% e 71,7%, respectivamente) (Figura 13 A). Por outro lado, a LSL não alterou a hipernocicepção induzida pela PGE2 em nenhuma das doses (Figura 13 B).

4.2.5. Lectina de *Lonchocarpus sericeus* reduz a migração de neutrófilos induzida por carragenina na pata de camundongos

A migração de neutrófilos foi mensurada através da dosagem de mieloperoxidase (MPO) no tecido da pata dos animais. A administração de carragenina (100 µg/pata; s.c.) induziu intenso acúmulo de neutrófilos para o interior da pata dos animais ($6,24 \pm 0,70 \times 10^{-6}$ neutrófilos/mg de tecido). O pré-tratamento e.v. com LSL nas doses de 3 e 10 mg/kg (e.v.) 15 min antes da administração intraplantar de carragenina reduziu de forma significativa ($p < 0.05$) o acúmulo de neutrófilos na pata dos animais. Esta redução foi de forma dose-dependente e alcançou níveis de $1,63 \pm 0,08 \times 10^{-6}$ neutrófilos/mg de tecido e $0,63 \pm 0,06 \times 10^{-6}$ neutrófilos/mg de tecido, respectivamente (inibição de 74 e 90%, respectivamente) (Figura 14).

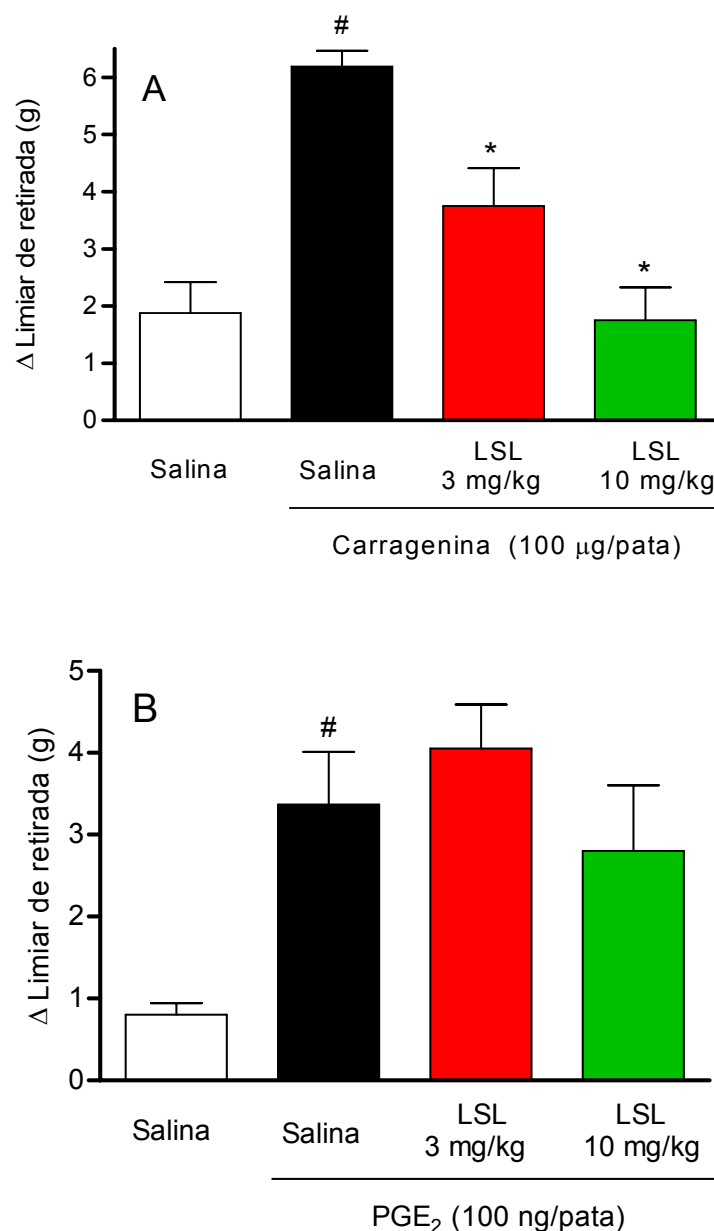


Figura 13 – Lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (LSL) reduz hipernocicepção mecânica induzida por carragenina, mas não por PGE. PAINEL A - hipernocicepção induzida por Cg. **PAINEL B** - hipernocicepção induzida por PGE₂. A hipernocicepção foi mensurada antes e 3 h após injeção nas patas traseiras de camundongo de veículo (salina) ou carragenina (100 μg) ou PGE₂ (100 ng/pata). Salina ou LSL (3 ou 10 mg/kg) foi injetada e.v. 15 minutos antes da administração dos estímulos. Os resultados são expressos com media ± E.P.M. da intensidade de hipernocicepção (Δ limiar de reação, g) (n=8). * indica significância estatística (p<0.05) comparado ao grupo Cg ou PGE₂ ; # comparado ao grupo salina (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

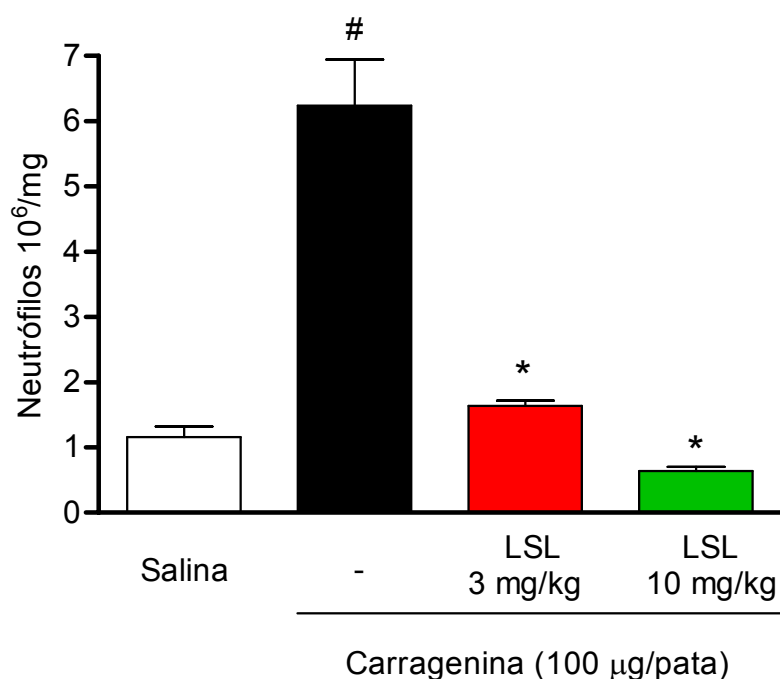


Figura 14 – Lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (LSL) reduz o influxo de neutrófilos na pata de camundongos estimulados com carragenina. Veículo (salina) ou LSL (3 ou 10 mg/kg) foram injetados e.v., e 15 minutos depois, carragenina (100 µg/pata; 0.25ml) foi administrado na pata traseira dos animais. O grupo controle negativo recebeu apenas salina. A atividade da mieloperoxidase na pata traseira foi usada como um indicador do influxo de neutrófilos. Os resultados são expressos como média ± E.P.M. do número de neutrófilos (n=6). * indica significância estatística (p<0.05) comparado ao grupo Carragenina (-); # comparado ao grupo salina (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

4.2.6 Lectina de *Lonchocarpus sericeus* reduz os níveis de TNF- α e IL-1 β nas patas de camundongos estimulados com carragenina.

A administração intraplantar de carragenina (100 μ g/pata; s.c.) induziu um significativo ($p < 0,05$) aumento nos níveis de TNF- α ($241,9 \pm 17,8$ pg/mL; painel A) e IL-1 β ($801,3 \pm 67,6$ pg/mL painel B) na pata dos animais após 2 horas do tratamento (Figura – 15). O pré-tratamento com LSL (3 ou 10 mg/kg), 15 min antes dos animais receberem carragenina s.c., reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) os níveis de TNF- α para valores de $130,4 \pm 8,78$ pg/mL e $88,67 \pm 6,15$ pg/mL respectivamente (inibição de 39,3 e 58,7%, respectivamente) (Figura 15 - painel A). LSL (3 ou 10 mg/kg) também reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) os níveis de IL-1 β para valores de $547,7 \pm 34,05$ pg/mL e $256,9 \pm 27,07$ pg/mL respectivamente (inibição de 31,3 e 68%, respectivamente) (Figura 15 – painel B).

4.2.7 Lectina de *Lonchocarpus sericeus* reduz os níveis MIP-1 e KC nas patas de camundongos estimulados com carragenina.

A administração intraplantar de carragenina (100 μ g/pata) induziu um significativo ($p < 0,05$) aumento nos níveis da quimiocinas CCL3/MIP-1 ($497 \pm 44,2$ pg/mL, painel A), CXCL1/KC ($2936 \pm 197,6$ pg/mL, painel B) e CXCL2/MIP-2 ($768,3 \pm 72,1$ pg/mL, painel C) na pata dos animais após 2 horas de tratamento (Figura 16). O pré-tratamento com LSL (3 ou 10 mg/kg) 15 min antes dos animais receberem carragenina i.p. reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) os níveis de MIP-1 para valores de $252,9 \pm 44,9$ pg/mL e $191,2 \pm 61,31$ pg/mL respectivamente (inibição de 49,1 e 61,5%, respectivamente) (Figura 16 - painel A). LSL somente na dose de 10 mg/kg conseguiu reduzir de forma significativa ($p < 0,05$) os níveis de KC para valor de $21166 \pm 136,7$ pg/mL (inibição de 29%) (Figura 16 - painel B). Os níveis de MIP-2 não foram reduzidos de forma significativa por nenhuma das doses usadas de LSL (Figura 16 - painel C)

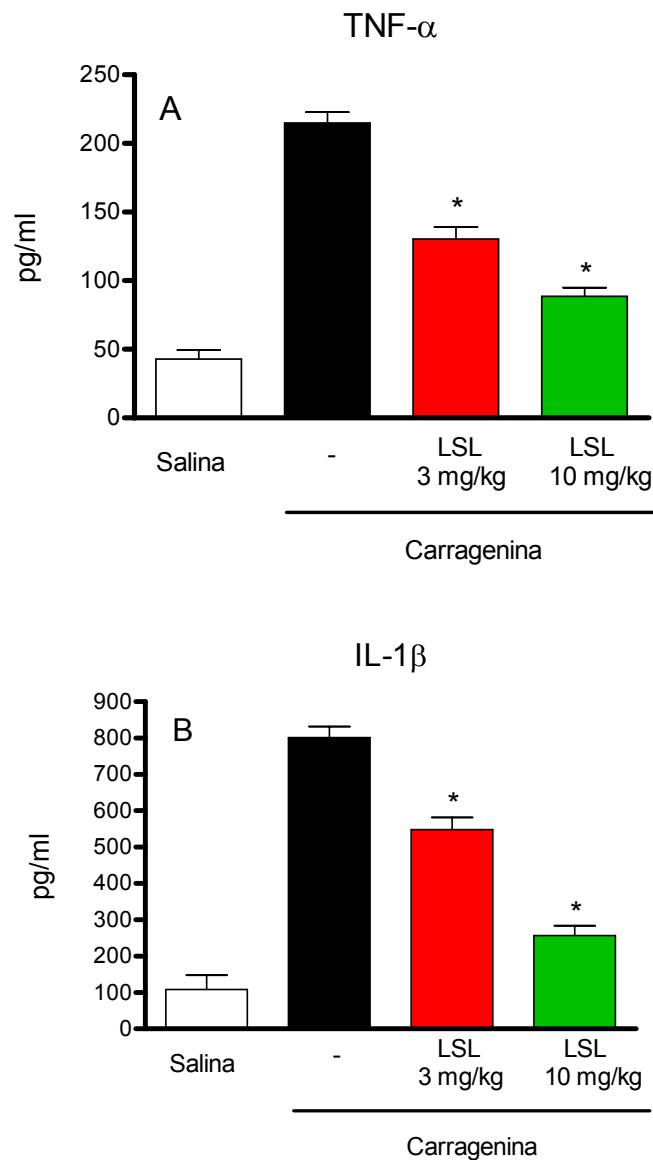


Figura 15 – Lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (LSL) reduz os níveis de citocinas (TNF- α e IL-1 β) na pata de camundongos estimulados com carragenina. PAINEL A – níveis de TNF- α . PAINEL B – níveis de IL-1 β . Os animais receberam salina (controle) ou LSL (3 ou 10 mg/kg) e.v. 15 minutos antes da administração carragenina (100 μ g/pata; s.c.). Os animais controle receberam salina s.c. A concentração das citocinas foi determinada por ELISA. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. de pg de citocina/mL (n=5). * indica significância estatística (p<0.05) comparado ao grupo Carragenina (-). (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

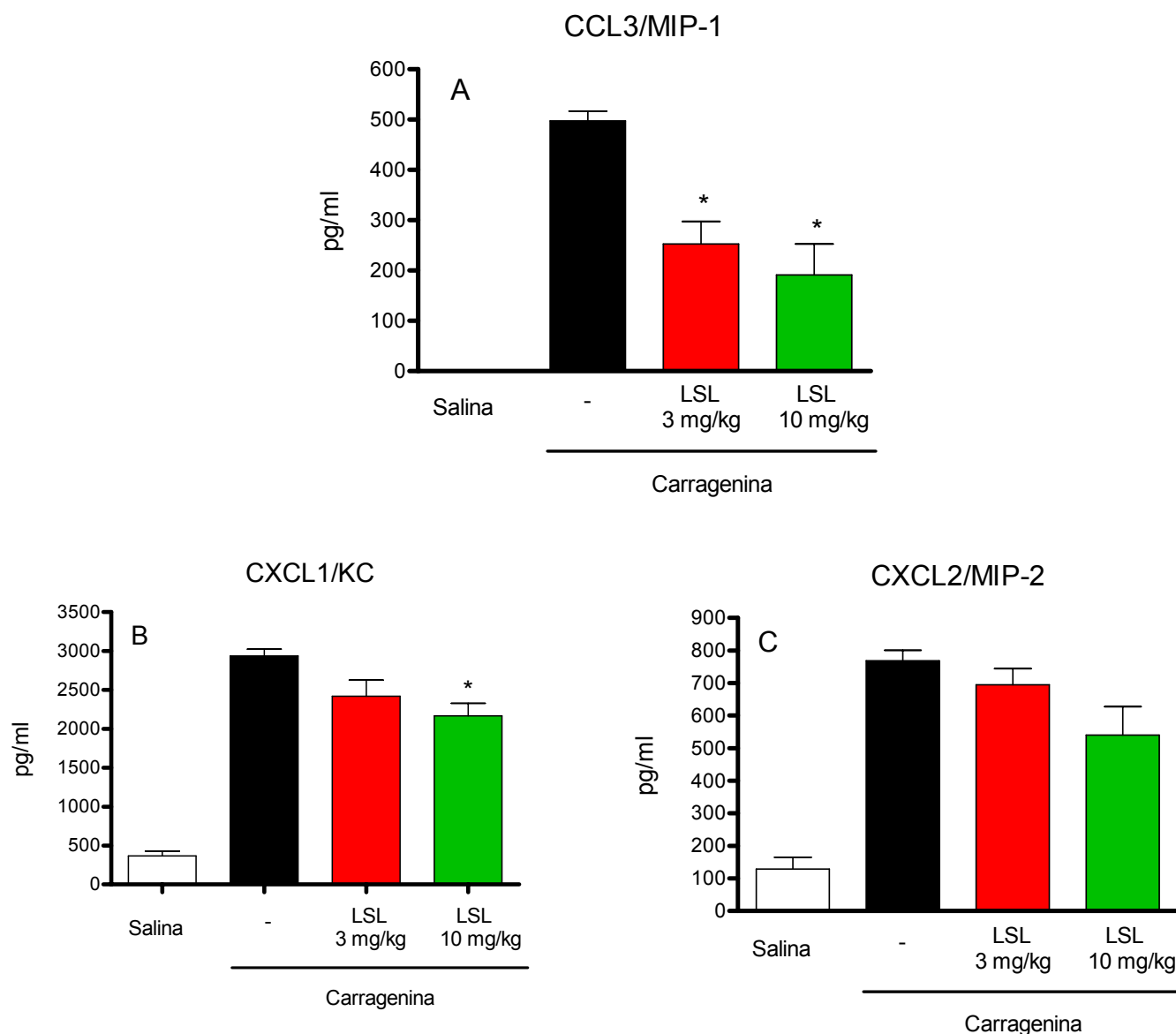


Figura 16 - Lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (LSL) reduz os níveis de MIP-1 e KC na pata de camundongos estimulados com carragenina. PAINEL A – níveis de CCL3. PAINEL B – níveis de CXCL1. PAINEL C – níveis de CXCL2. Os animais receberam salina (-) ou LSL (3 ou 10 mg/kg) e.v. 15 minutos antes da administração de carragenina (100µg/pata; s.c.). Os animais controle receberam apenas salina s.c. A concentração das quimiocinas foi determinada por ELISA. Os resultados são expressos como média \pm E.P.M. de pg de quimiocina/mL (n=5). * indica significância estatística ($p < 0.05$) comparado ao grupo Carragenina (-). (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

4.2.8 Lectina de *Lonchocarpus sericeus* reduz a hiperalgesia mecânica induzida por OVA em camundongos imunizados.

Após a administração intraplantar de OVA (3 μ g/pata; s.c.) nos camundongos imunizados ocorreu um significativo efeito nociceptivo ($p < 0.05$) quando comparado aos animais falso imunizados. Este efeito foi observado pelo aumento na diferença do limiar de retirada ($3,80 \pm 0,83$ g). O tratamento e.v. com LSL (3 e 10mg/kg), 15 min antes dos animais receberem o estímulo nociceptivo (OVA) reduziu de forma significativa ($p < 0,05$) o limiar de retirada para valores de $0,71 \pm 0,20$ g e $0,47 \pm 0,20$ g, respectivamente (redução de 81,3 e 87,6%, respectivamente) (Figura 17).

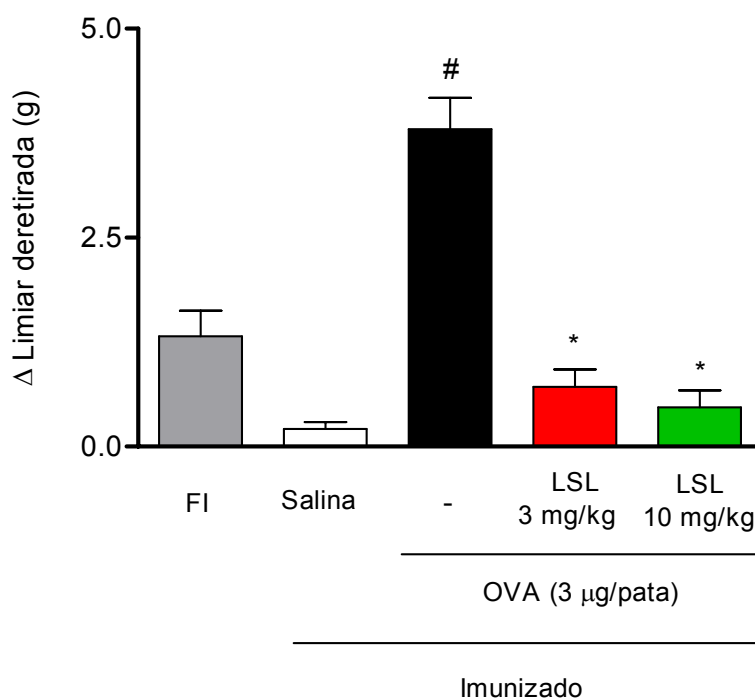


Figura 17 – Lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (LSL) reduz a hipernociceção induzida por ovoalbumina (OVA) em camundongos. A hipernociceção mecânica foi avaliada depois de 3h da administração de 3 μg/pata de ovoalbumina (OVA) (intraplantar) em camundongos imunizados (-) ou falso-imunizados (FI). Os camundongos imunizados (controle) receberam a administração de salina (25 μl/pata). No grupo tratado LSL (3 e 10 mg/kg) foi administrada 15 min. antes da administração de OVA. Os resultados são expressos com média ± E.P.M. da intensidade de hipernociceção (Δ limiar de reação, g) (n=6) * indica significância estatística (p<0.05) quando comparado ao grupo injetado com OVA (-) # comparado ao grupo salina (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

4.3 ESTUDO DA ATIVIDADE DA *Lonchocarpus sericeus* SOBRE O SISTEMA NERVOSO CENTRAL

4.3.1 Lectina de *Lonchocarpus sericeus* não modificou a coordenação motora de camundongos no teste de *rota rod*.

Entre os grupos salina e LSL (10 mg/Kg) administrados e.v. em camundongos, 30 min antes de serem colocados na barra, não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Os animais do grupo controle apresentaram um tempo de permanência na barra de $119,6 \pm 0,3$ segundos, enquanto que nos animais do grupo tratado com LSL (10 mg/kg) o tempo de permanência na barra foi de $119,5 \pm 0,4$ segundos. Somente o grupo administrado com diazepam, usado como controle (2 mg/Kg; i.p.) mostrou uma perda da coordenação motora significativa ($18,5 \pm 5,2$ segundos), quando comparados aos do grupo de animais não tratados ($p < 0,05$) (Figura 18).

4.3.2 Lectina de *Lonchocarpus sericeus* não modificou a locomoção espontânea de camundongos no teste de campo aberto.

Entre os grupos salina e LSL (10 mg/Kg) administrados e.v., em camundongos, 30 min antes de serem colocados no campo aberto, não houve diferença estatística significativa ($p > 0,05$). Os animais do grupo controle apresentaram um deslocamento de $58 \pm 3,8$ campos explorados/4 min, enquanto que os animais do grupo tratado com LSL (10 mg/kg) apresentaram um deslocamento de $51 \pm 7,8$ campos explorados/4 min (Figura 19).

4.3.3 Lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* não alterou o tempo de imobilização dos camundongos no teste de nado forçado.

Entre os grupos salina e LSL (10 mg/Kg) administrados e.v., em camundongos, 30 min antes de serem colocados na água para verificar o tempo de imobilização, não houve diferença estatística significativa ($p>0,05$). Os animais do grupo controle apresentaram um tempo de imobilização de $136,3 \pm 15$ segundos, enquanto que os animais do grupo tratado com LSL (10 mg/kg) apresentaram um tempo de imobilização de $113,6 \pm 11,3$ segundos (Figura 20).

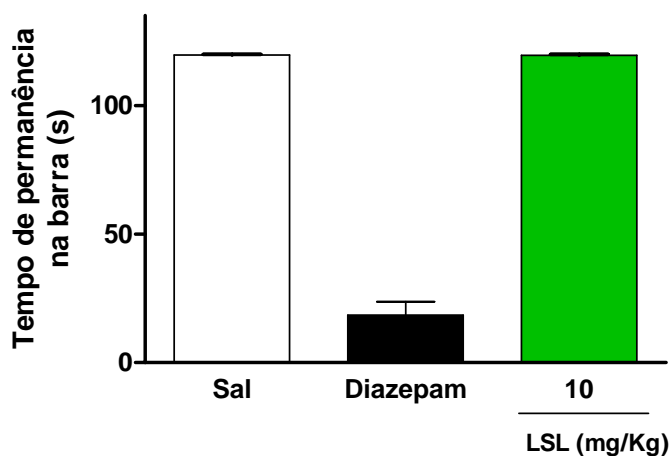


Figura 18 – A coordenação motora de camundongos não é afetada pela administração da lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (LSL). Os animais receberam 30 min antes de serem colocados sobre a barra: salina (controle; e.v.) ou diazepam (2 mg/Kg; i.p.) ou LSL (10 mg/Kg; e.v.), respectivamente. Os valores representam a média \pm E.P.M do tempo de permanência na barra em segundos (s) durante 2 minutos (n=8). * $p < 0,05$ indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle. (ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

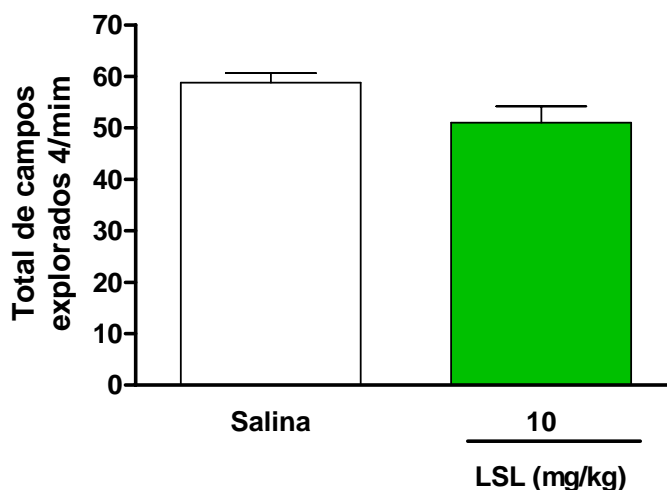


Figura 19 – A locomoção espontânea de camundongos não é afetada com a administração da lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (LSL). Os animais receberam 30 min antes de serem colocados no campo aberto: salina (controle; e.v.) ou LSL (10 mg/Kg; e.v.), respectivamente. Os valores representam a média \pm E.P.M do total de campos explorados durante 4 minutos. * $p < 0,05$ indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle. (Test Student).

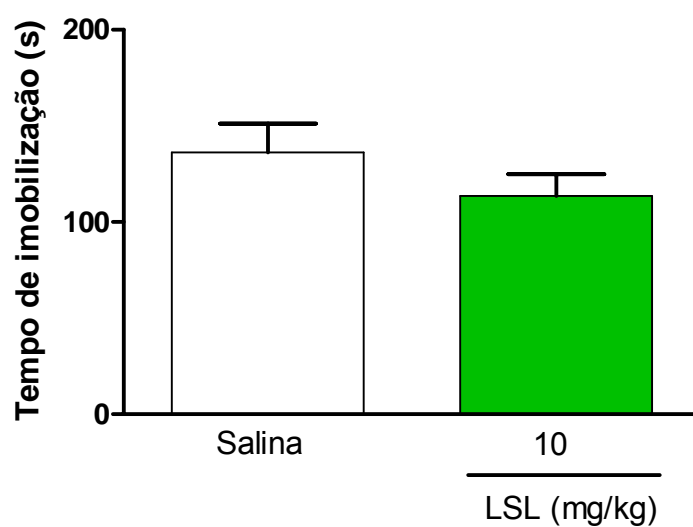


Figura 20 – Lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (LSL) não provoca efeito depressor em camundongos. Os animais receberam 30 min antes de serem colocados na água: salina (controle; e.v.) ou LSL (10 mg/Kg; e.v.), respectivamente. Os valores representam a média \pm E.P.M do do tempo de imobilização (segundos). * $p < 0,05$ indica diferença estatística significativa quando comparado ao grupo controle. (Test Student).

4.4 EFEITO DO TRATAMENTO AGUDO COM LECTINA DE SEMENTES DE *Lonchocarpus sericeus* EM CAMUNDONGOS

LSL (10 mg/Kg; e.v.) quando administrada em um esquema posológico de dose diária única durante sete dias consecutivos não afetou significativamente ($p < 0,05$) a massa corporal dos camundongos ou o peso úmido dos órgãos avaliados (fígado, rim e coração), comparados com os animais que receberam somente salina estéril no mesmo esquema posológico. Todos os órgãos avaliados demonstraram aparência normal e ausência de edema ao final do tratamento agudo com a lectina. Adicionalmente, a avaliação macroscópica do estômago demonstrou uma mucosa intacta e sem lesões visíveis em ambos os grupos avaliados (LSL ou salina). Os valores de uréia obtidos, usados como parâmetro para a avaliação da função renal não foi significativamente ($p < 0,05$) diferentes dos animais controle. Quando comparado com o controle (salina) a função hepática avaliada pela cinética das enzimas hepáticas (alanina amino transferase-ALT e aspartato amino transferase-AST) e o número de leucócitos circulantes no sangue não foram alterados significativamente ($p < 0,05$) pelo tratamento com a lectina. A dose utilizada no tratamento agudo foi à mesma que demonstrou atividade antiinflamatória e antinociceptiva (Tabela 1).

Tabela 1 – Tratamento agudo dos camundongos com *Lonchocarpus sericeus* (LSL) não induz toxicidade sistêmica

Parâmetros	Tratamento (0.1 mL; i.v.)	
	Salina	LSL (10 mg/Kg)
Massa corporal (g) depois	33.3 ± 0.4	30.7 ± 0.1
Massa corporal (g) antes	34.8 ± 0.6	29.6 ± 0.8
Fígado (g/10 g peso corporal)	0.45 ± 0.0	0.50 ± 0.0
Rim (g/10 g peso corporal)	0.06 ± 0.0	0.07 ± 0.0
Coração (g/10 g peso corporal)	0.05 ± 0.0	0.05 ± 0.0
Leucócitos totais x 10³/mL	6119 ± 503.9	9144 ± 1117.0
Neutrófilos x 10³/mL	1265 ± 153.3	1138 ± 153.4
Uréia (mg/dL)	48.0 ± 1.3	46.0 ± 2.2
ALT (UI/L)	33.2 ± 2.3	32.8 ± 3.4
AST (UI/L)	52.7 ± 3.4	62.1 ± 4.8

Os camundongos foram administrados com doses diárias únicas durante sete dias consecutivos. Após sete dias de tratamento, os animais foram pesados, amostras de sangue foram coletadas para avaliar o leucograma e dosagens bioquímicas, posteriormente os animais foram sacrificados e os órgãos ainda úmidos foram pesados. Os valores são apresentados como média ± E.P.M. (Test Student)

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Os principais leucócitos a participarem na defesa contra patógenos são os neutrófilos, entretanto, em alguns casos a infiltração excessiva destas células com liberação de grandes quantidades de mediadores inflamatórios, enzimas lisossomais e radicais livres leva ao dano tecidual. Isto é comum em diversas doenças de cunho imune inflamatório (MALECH; GALLIN, 1987; JONES *et al.*, 1991).

Este estudo foi baseado nos primeiros dados descritos por Alencar *et al.*, 1999, que demonstram que a lectina de semetes de *Lonchocarpus sericeus* reduz a peritonite e o edema de pata induzidos por carragenina em ratos e que este efeito pode estar relacionado com o efeito lectínico. O atual estudo realizado em camundongos demonstrou que a mesma lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (LSL) apresenta uma eficiente capacidade de inibir a infiltração de neutrófilos induzida por agentes inflamatórios inespecíficos (carragenina) e antigênicos (ovalbumina).

A carragenina é uma substância caracterizada por elicitar a liberação de vários mediadores inflamatórios, tais como aminas biogênicas na primeira fase, que são responsáveis pelo desenvolvimento dos eventos vasculares, que numa segunda fase é mantida por outros mediadores, tais como citocinas (IL-1 e TNF- α), prostaglandinas e óxido nítrico. Associado a isso, esse edema também é caracterizado por apresentar um infiltrado celular intenso, onde destaca-se a presença de neutrófilos com produção de radicais livres derivados do oxigênio (MORRIS *et al.*, 2003).

O tráfego de neutrófilos para o tecido lesionado por trauma, agentes flogísticos ou imunógenos é um processo seqüencial e coordenado que requer uma série de moléculas que reagem sincronicamente (citocinas/quimiocinas, selectinas, integrinas, moléculas de adesão). Leucócitos podem responder a TNF- α e IL-1 β ativando e expressando integrinas, produzindo fator ativador de plaquetas, e outros mediadores. Embora ambas as citocinas (TNF- α e IL-1 β) não sejam agentes quimiotáticos diretos, estas moléculas mobilizam selectinas de células endoteliais e produzem supra regulação “up regulation” das moléculas de adesão celular. Por outro lado, citocinas sinérgicas podem induzir a produção de quimiocinas, as quais

podem contribuir para um aumento no rolamento, adesão e quimiotaxia de leucócitos (WAGNER; ROTH, 2000).

Neste estudo foi demonstrado que LSL é capaz de reduzir a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de camundongos administrados com carragenina. Esta inibição da migração ocorre pela redução da intensidade de interação entre os leucócitos e o endotélio (rolamento e adesão) em resposta a administração de carragenina. LSL também se mostrou hábil em reduzir a liberação de citocinas/quimiocinas, este mecanismo também pode estar relacionado com a redução do influxo de neutrófilos para o sítio da injúria, uma vez que estes mediadores atuam expressando moléculas de adesão, aumentando a avidéz de ligação entre estas moléculas de adesão, ativando neutrófilos e promovendo quimiotaxia.

A adesão ao endotélio é um pré-requisito para a infiltração dos neutrófilos no local da inflamação. Este processo é mediado pelas selectinas, que através de domínios lectínicos reconhecem e interagem de forma específica com carboidratos de superfície. Entre as moléculas envolvidas na adesão firme de neutrófilos estão CD11b/CD18 (nos neutrófilos) ou ICAM-1 e VCAM-1 nas células endoteliais (ROBBINS *et al.*, 2005).

Estudos da base molecular de adesão de selectinas têm sido focalizados principalmente no reconhecimento de carboidrato pelo domínio lectínico (FEIZI, 1993; ROSEN; BERTOZZI, 1994). A identificação de ligantes fisiológicos para selectinas tem sido alvo de muitos estudos, pois como muitas lectinas, as selectinas podem se ligar a uma variedade de estruturas de carboidratos *in vitro* (TEDDER *et al.*, 1995). Lectinas vegetais já foram sugeridas como sendo moléculas capazes de bloquear essa ligação e assim inibir a migração celular *in vivo* (ASSREUY *et al.*, 1997; 1999; ALENCAR *et al.*, 1999). Assim, não se pode descartar a possibilidade de que LSL possa eventualmente estar bloqueando o sítio para ligação para as selectinas endógenas e desta forma impedir a migração de neutrófilos por reduzir o rolamento e adesão.

Outros mediadores influenciam na expressão de moléculas de adesão, tais como o óxido nítrico (NO). Está bem demonstrado na literatura a participação do

óxido nítrico (NO) no processo inflamatório e nociceptivo. Estes estudos demonstraram que o NO também interfere com o recrutamento de neutrófilos podendo inibir ou induzir a migração dessas células (IALENTI *et al.*, 2000; PAUL-CLARK *et al.*, 2001; MCCARTNEY-FRANCIS *et al.*, 2001).

Kubes *et al.* (1991) demonstraram em seus resultados, que o NO pode ser um importante inibidor endógeno de adesão leucocitária em vênulas pós-capilares, pois a inativação do NO pela produção identificada de O_2^- pelas células endoteliais e/ou neutrófilos, ou a inativação da produção do NO pelos inibidores de NOS (L-NAME) pôde contribuir com a aderência leucocitária.

Secco *et al.* (2006) demonstraram que o efeito inibitório do NO sobre a expressão de ICAM-1 é mediado via ativação da guanilato ciclase solúvel, pois inibidores da NOS e o inibidor solúvel da guanilato ciclase (ODQ) foram capazes de aumentar a migração de neutrófilos em modelo de peritonite induzida por Cg e LPS, mas os animais tratados com um doador de NO (S-nitroso-N-acetilpenicilamina) foram capazes de apresentar uma redução na migração dessas células.

De acordo com Liaudet *et al.* (2000) a ativação da guanilato ciclase solúvel pelo NO constitui a principal via de sinalização deste gás, que envolve a regulação de uma disposição vasta de funções biológicas, incluindo não só o relaxamento do músculo liso seja ele vascular ou não vascular, mas também como transdutor no sistema nervoso central, inibição da agregação plaquetária e inibição da adesão leucocitária no endotélio.

A produção de NO induzida por lectinas de leguminosas isoladas de *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea grandiflora*, *Pisum arvense* e *Concanavalina A* foi demonstrado por Andrade *et al.* (1999), ao qual evidenciaram a capacidade dessas lectinas em induzirem a produção de NO *in vitro* e *in vivo* por macrófagos peritoneais através da administração local dessas lectinas. Estes autores sugerem que este efeito pode estar envolvido nas atividades antitumoral e antiparasitária dessas lectinas.

Mais recentemente, em outro estudo realizado *in vitro* demonstrou-se que macrófagos murinos quando isolados do peritônio, e tratados com a lectina de *Concanavalina A*, foram capazes de induzir um aumento na produção de NO e na expressão de NOSi por diferentes ligantes aos receptores Toll-like (SODHI *et al.*,

2007). Keshewani e Sodhi (2007) também demonstraram, *in vitro*, a capacidade de lectina de Concanavalina A e a fitohemaglutinina em induzir a produção de NO e a expressão de NOSi em macrófagos murinos.

Lima *et al* (2004) evidenciaram que a lectina de *Bryothamnion triquetrum* foi capaz de promover relaxamento de anéis de aorta isolados de rato dependente de óxido nítrico e que a associação da lectina com mucina inibiu o relaxamento induzido por esta. Sugerindo a importância do domínio lectínico com seu ligante específico. Mais tarde, Gadelha *et al* (2005) demonstrou que a lectina de *Canavalia marítima* foi capaz de induzir relaxamento da aorta isolada de ratos dependente de NO.

Diante das informações expostas, fomos investigar se a atividade antiinflamatória demonstrada pela LSL poderia estar relacionada à produção de NO. Verificamos então se o tratamento e.v. com a LSL acarretaria em modificações nos níveis sanguíneos de NO. Como resultado, demonstrou-se que a LSL foi capaz de aumentar a produção de NO (via aumento dos níveis de nitrito) no soro dos animais submetidos à peritonite induzida por Cg. Este resultado foi reforçado pelo efeito reversor do inibidor da síntese de NO (aminoguanidina) sobre a atividade da LSL na migração de neutrófilos induzida por carragenina. Sugerindo então que, provavelmente esta liberação de NO induzida pela LSL também pode estar relacionado com a redução da expressão de moléculas de adesão com conseqüente redução da migração de leucócitos para o sítio da injúria.

Adicionalmente, LSL foi incapaz de inibir a migração de neutrófilos *in vitro* induzida diretamente por MIP-2 (quimioatratador direto para neutrófilos), sugerindo assim, que esta lectina não atua diretamente na célula inflamatória (neutrófilo) para inibir a migração. Isso reforça a teoria de que LSL apresenta um mecanismo indireto de inibição.

Após a discussão dos prováveis mecanismos de inibição da migração de neutrófilos, elaboramos as seguintes hipóteses: 1) a lectina atua inibindo a produção de citocinas/quimiocinas e desta forma reduzindo a migração e quimiotaxia de neutrófilos.; e/ou 2) a lectina quando injetada sistemicamente é capaz de induzir a produção de NO e/ou 3) a lectina age diretamente sobre as moléculas de interação leucócito/endotélio bloqueando o sítio de ligação para as selectinas endógenas e reduzindo o rolamento .

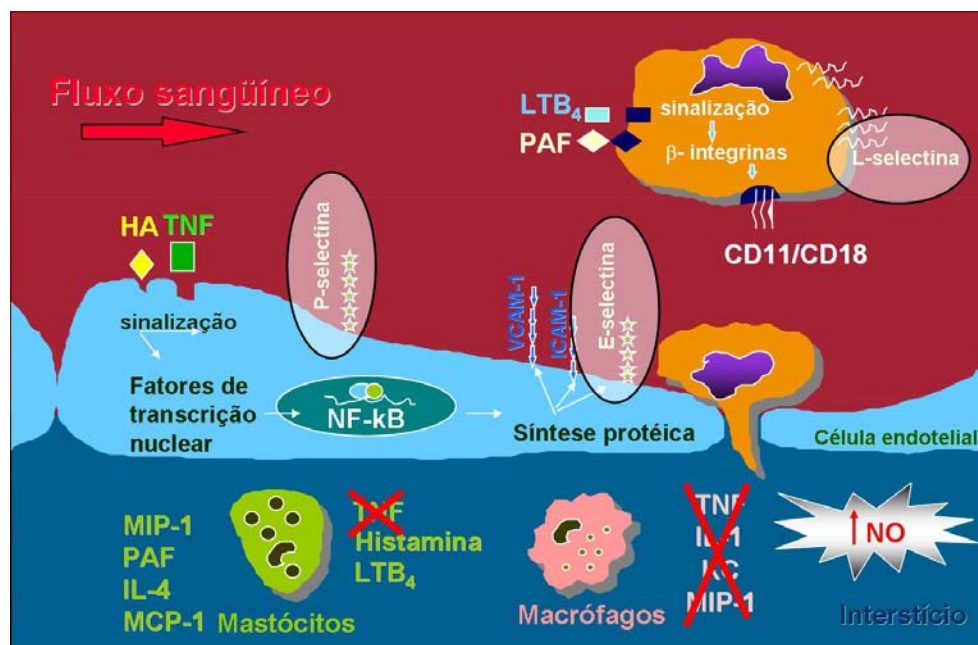


Figura 21 – Representação esquemática da hipótese do efeito antiinflamatório da lectina de *Lonchocarpus sericeus*. LSL quando injetada sistemicamente (e.v.) pode possivelmente bloquear o sítio de ligação para as selectinas endógenas e/ou reduzir a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e/ou aumentar os níveis sistêmicos de óxido nítrico. Estes mecanismos podem estar explicar com a atividade inibitória da LSL sobre a migração de neutrófilos.

O interesse para o uso clínico de novas substâncias com atividade analgésicas, vem aumentando significativamente e vários modelos de nocicepção em animais de laboratório foram desenvolvidos para verificar a atividade analgésica de extratos e compostos. O teste de contorções abdominais induzida por ácido acético é descrito como um típico modelo para avaliar a dor de origem inflamatória e utilizada na indústria para pesquisa de drogas com atividade analgésica (PORECCA *et al.*, 1987) Porém este modelo é pouco específico uma vez que drogas não analgésica como: Atropina, antihistamínicos, antidepressivos tricíclicos e antihipertensivos são capazes de inibir as contorções neste modelo (CHERNOV *et al.*, 1967; TAKAHASHI; PAZ, 1987; YEH, 1986). O comportamento de contorções em camundongos é utilizado para avaliar um possível potencial analgésico central e/ou periférico de drogas, uma vez que o ácido acético induz algesia através da liberação de substâncias inflamatórias por macrófagos e mastócitos peritoneais, além da sensibilização das fibras sensoriais aferentes periféricas (RIBEIRO *et al.*, 2000). Apesar da baixa especificidade, esse teste pode ser considerado um teste pré-clínico de importância para avaliação do efeito antinociceptivo, porque permite

uma correlação adequada entre o valor da dose eficaz, obtido em animais, e as doses analgésicas em humanos (COLLIER *et al.*, 1968).

Neste modelo, a administração de um agente irritante na membrana serosa, como o ácido acético, provoca comportamentos estereotipados que são caracterizados por contorções abdominais, redução e incoordenação da atividade motora. Estes comportamentos são considerados reflexos e evidenciam a dor visceral (LE BARS *et al.*, 2001). A irritação local, provocada pela administração deste agente na cavidade intraperitoneal desencadeia a liberação de vários mediadores como a bradicinina, substância P e prostaglandinas, bem como algumas citocinas como IL-1 β , TNF α e IL-8. Adicionalmente o influxo de leucócitos parece amplificar este processo (RIBEIRO *et al.*, 2000; IKEDA *et al.*, 2001). Estes mediadores ativam nociceptores quimiossensíveis que contribuem com o desenvolvimento da dor de origem inflamatória. No nosso estudo observamos que a administração sistêmica, e.v. de LSL reduziu, de maneira significativa, o número de contorções abdominais produzidas pela injeção i.p. de ácido acético em camundongos, sugerindo que este efeito antinociceptivo pode estar relacionado com qualquer uma das vias citadas anteriormente. Além disso, um inibidor clássico da síntese de prostaglandinas (ácido acetilsalicílico) também foi capaz de reduzir o número de contorções abdominais.

Outro modelo empregado para investigação de substâncias com potencial antinociceptivo é o de nocicepção induzida por formalina. A resposta provocada pela formalina constitui-se duas fases de nocicepção: uma fase inicial e uma tardia, que parecem envolver mediadores químicos diferentes (TJOLSEN; HOLE, 1997; VANEGAS; SCHAIBLE, 2001).

A fase inicial é caracterizada pela dor de origem neurogênica causada pela estimulação química direta dos nociceptores das fibras sensoriais aferentes, principalmente fibras do tipo C. A fase tardia é representada pela dor de origem inflamatória que é desencadeada por uma combinação de estímulos que incluem inflamação nos tecidos periféricos e mecanismos de sensibilização espinhal e central. Diversos mediadores inflamatórios (bradicinina, histamina, serotonina, prostaglandinas, citocinas, aminas simpatomiméticas dentre outros) estão relacionados com desenvolvimento desta atividade nociceptiva (TJØSEN *et al.*,

1992; TJOLSEN; HOLE, 1997; HONG; ABBOTT, 1996, JOURDAN *et al.*, 1997, HAMA; MENZAGHI, 2001, LE BARS *et al.*, 2001; PARADA *et al.*, 2001).

Com os resultados obtidos neste trabalho foi possível mostrar que a LSL inibiu o tempo de lambedura das patas dos animais, somente na segunda fase do teste. Conforme já descrito na literatura, drogas com efeitos centrais como a morfina e outros narcóticos, inibem ambas as fases do teste (HUNSKAAR *et al.*, 1985; SHIBATA *et al.*, 1989), mas a ação de drogas antiinflamatórias (DAINES e dexametasona) que inibem a formação ou a ação dos mediadores inflamatórios e nociceptivos inibem somente a segunda fase na nocicepção induzida por formalina (SHIBATA *et al.*, 1989; CHEN *et al.*, 1995). Esses resultados sugerem uma possível ação da LSL na nocicepção de cunho inflamatório, e esta ação pode estar relacionada com a síntese e/ou ação destes mediadores nociceptivos e inflamatórios. Além disso, em nossos resultados, morfina foi capaz de reduzir ambas as fases do teste, confirmando os dados da literatura.

O teste da placa quente indica a resposta ao estímulo térmico que é associado à neurotransmissão central (HUNSKAAR *et al.*, 1996). O comportamento do animal de “sapatear” ou lambear as patas é a indicação da resposta ao estímulo nociceptivo térmico, enquanto que a latência para o aparecimento desta resposta é cronometrada em segundos.

LSL não foi capaz de apresentar efeito antinociceptivo no teste da placa quente, desta forma não aumentou o tempo de reação dos animais, somente à morfina aumentou significativamente o tempo de reação. Estes resultados reforçam os achados no teste da formalina, onde a LSL não apresentou atividade antinociceptiva de cunho neurogênico.

Para investigar mais detalhadamente a atividade da LSL na dor de origem inflamatória, delineamos um estudo com atividade hiperalgésica, em modelos de hiperalgesia mecânica (Von Frey). Posteriormente, tentamos explicar estes efeitos antinociceptivos através de uma possível interação da atividade antihiperalgésica com a atividade antiinflamatória (inibição da migração e neutrófilos) já citada anteriormente e em outros trabalhos (ALENCAR *et al.*, 2005a).

Neste presente estudo, nós demonstramos que o pré-tratamento de camundongos com LSL inibiu a hipernocicepção inflamatória induzida por

carragenina. Esta atividade antihiperálgica parece compartilhar do mesmo mecanismo da atividade antiinflamatória, uma vez que neste modelo de hiperálgia, LSL foi capaz de reduzir a migração de neutrófilos para a pata de camundongos administrados com carragenina. Em adição, esta lectina também se mostrou hábil em reduzir a liberação de citocinas/quimiocinas o qual pode está relacionado com a redução do influxo de neutrófilos para o sítio da injúria (pata dos camundongos tratados com carragenina).

Durante estudos para elucidação dos mecanismos celulares que envolvem a hipernocicepção inflamatória, tem sido demonstrado que estímulos inflamatórios nem sempre atuam diretamente induzindo a liberação de prostaglandinas e aminas simpáticas. Entretanto, uma já bem definida e sequenciada cascata de citocinas/quimiocinas precedem a liberação destes mediadores hipernociceptivos finais (FERREIRA *et al.*, 1988, CUNHA *et al.*, 1991; LORENZETTI *et al.*, 2002; CUNHA *et al.*, 1992; CUNHA *et al.*, 2005;). A hipernocicepção mecânica induzida por carragenina consiste de um componente periférico que envolve sensibilização dos nociceptores por liberação de prostaglandinas e aminas simpatomiméticas. Este processo é iniciado pela liberação de TNF- α , o qual estimula a formação de interleucinas (IL-1 β e IL-6) e formação de quimiocinas (CINC-1 em ratos e KC em camundongos). Subsequentemente, IL-1 β e IL-6 podem estimular a produção de prostaglandinas (FERREIRA *et al.*, 1988, CUNHA, *et al.*, 2005). Além disso, quimiocinas são capazes de induzir a liberação de aminas simpatomiméticas por fibras nervosas simpáticas (CUNHA *et al.*, 1991; 2005).

Nós demonstramos que a administração de LSL reduz significativamente as concentrações de citocinas (TNF- α e IL-1 β) e quimiocinas (CCL3, CXCL1) na cavidade peritoneal e tecido intraplantar estimulados com a administração de carragenina. Estes dados indicam que o efeito antihiperálgico pode ocorrer devido ao bloqueio da produção de citocinas e quimiocinas, sendo este efeito um evento inicial o qual reduz a expressão de selectinas e moléculas de adesão celular nas células endoteliais, o que resulta numa redução do número de leucócitos que rolam e aderem ao endotélio vascular (confirmado no ensaio de microscopia intravital). Além disso, a redução de citocinas como TNF- α e IL-1 β podem culminar na redução da liberação de mediadores hiperálgicos finais como as prostaglandinas e aminas

simpáticas, desta forma inibindo indiretamente o comportamento hiperalgésico dos animais.

Esta hipótese é reforçada pelo fato da administração de LSL não inibir a hipernocicepção mecânica induzida por prostaglandina E_2 , o qual se trata de um mediador hiperalgésico final no processo de liberação de mediadores hipernociceptivos, os quais podem ser induzidos por citocinas/quimiocinas (citado anteriormente).

Outras hipóteses adicionais podem ser utilizadas para explicar a atividade antihiperalgésica. Como relatado anteriormente LSL foi capaz de induzir a produção de óxido nítrico (NO), o qual é um modulador negativo da resposta nociceptiva. A administração de NO causa analgesia acompanhada de aumento na produção de GMP_c nos neurônios sensoriais periféricos primários (DUARTE *et al.*, 1992; FERREIRA *et al.*, 1991). Ferreira *et al.* (1999) demonstraram que a administração de doadores de óxido nítrico bloqueia a hiperalgesia induzida por PGE_2 e esse efeito é revertido por L-NAME (L-nitro arginina metil éster) e azul de metileno (inibidor de guanilato ciclase). Ferreira *et al.* (1991) propuseram ainda que opióides e analgésicos periféricos como dipirona e diclofenaco causam analgesia por estimular a via L-arginina/óxido nítrico/ GMP_c .

Nosso resultados demonstraram um aumento na produção de NO, e este aumento pode além de estar relacionado com a redução da migração celular, também ser diretamente responsável pela atividade antihiperalgésica em animais pré-tratados com LSL.

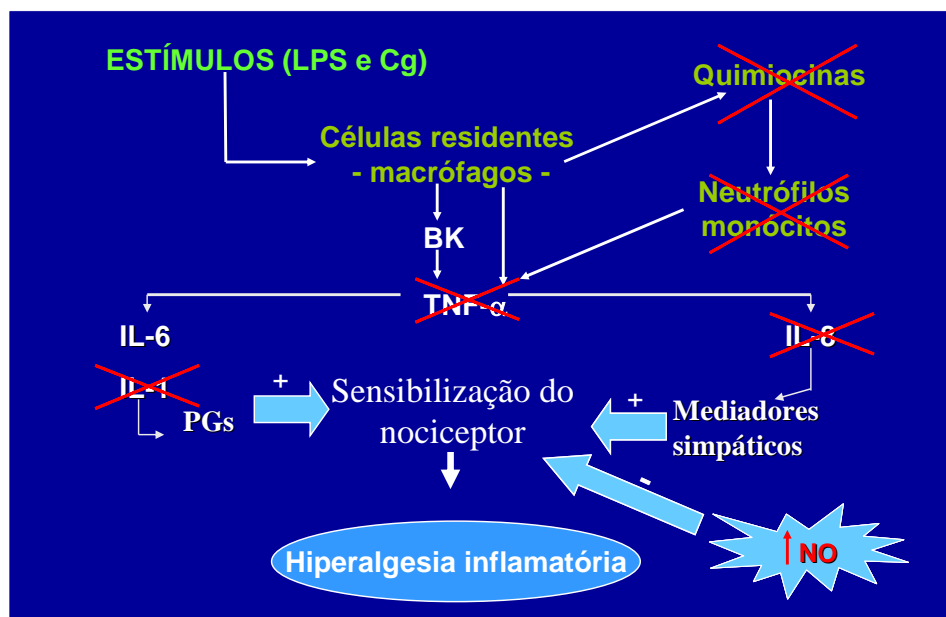


Figura 22 – Representação esquemática da hipótese do efeito antinociceptivo da lectina de *Lonchocarpus sericeus*. LSL quando injetada sistemicamente (e.v.) possivelmente reduz a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e hiperalgésicas. Estas citocinas são responsáveis pelo aumento da síntese de mediadores hiperalgésicos e pela migração de neutrófilos que amplifica o processo de hiperalgesia. LSL pode também estar elevando os níveis de óxido nítrico, o qual é um mediador químico com atividade antinociceptiva.

Apesar das respostas imunes serem geralmente protetoras, em alguns casos estas respostas podem ser inapropriadas, produzindo inflamação, injúria tecidual e dor o qual contribuem para o surgimento e amplificação de importantes patologias como a asma e a artrite reumatóide. Atualmente, poucos estudos são realizados no intuito de investigar as influências nociceptivas em reações imunologicamente mediadas. Cunha *et al.* (2003a), demonstraram que ratos imunizados e desafiados com ovoalbumina produzem mediadores responsáveis pela hipernocicepção mecânica, este estudo sugeriu que $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ e CINC-1 induzem liberação de prostaglandinas, aminas simpáticas e leucotrieno B4 em animais sensibilizados e desafiados com o antígeno. Outros estudos tem demonstrado a contribuição de endotelinas endógenas na resposta nociceptiva na pata traseira de camundongos sensibilizados e desafiados com ovoalbumina, estes estudos sugerem que a administração de ovoalbumina produz nocicepção associada a uma reação imunologicamente mediada com participação de degranulação mastocitária e envolvimento da liberação de endotelinas que parecem atuar em receptores ETA e ETB (PIOVEZAN *et al.*, 2004).

Nosso estudo demonstrou que a administração de LSL reduz significativamente a hipernocicepção induzida por ovoalbumina, este efeito provavelmente se deve a redução notável na migração de neutrófilos o que pode estar associada com a redução na liberação de citocinas (IL-1 e TNF- α) e quimiocinas (CCL3 e CXCL1), ou ainda ao aumento nos níveis de NO.

Os resultados obtidos no presente também demonstraram que a LSL não causou incoordenação motora e nem apresentou qualquer interferência sobre a atividade locomotora, uma vez que esta lectina não alterou os padrões de locomoção nos testes de Rota rod. A ação depressora de diversas drogas analgésicas sobre o sistema nervoso central e sobre o sistema muscular pode gerar redução de coordenação motora em animais, assim como na expressão do comportamento nociceptivo (SOJA *et al.*, 2002)

Um impedimento locomotor relacionado à administração de substâncias algogênicas reflete o estado de imobilidade prolongada “freezing” dos animais entre os episódios comportamentais de dor. A dor produz diferentes reações autonômicas e comportamentais, dependendo da sua localização, e o teste de campo aberto permite uma fácil observação destas condições (CAVUN *et al.*, 2004). A Administração de LSL não interferiu na locomoção dos camundongos quando comparados ao grupo controle (salina), reforçando os dados obtidos no teste de rota rod e sugerindo então que LSL não apresenta efeitos centrais.

O padrão de imobilidade do nado forçado tem sido considerado similar a algumas manifestações da depressão psiquiátrica e utilizada experimentalmente como parâmetro em estudos de fins práticos para a triagem de drogas antidepressivas (DETKE *et al.*, 1997; LUCKI, 1997). O nado é uma defesa para acidentes naturais, tais como inundações ou queda involuntária na água. A inescapabilidade nestas situações pode gerar imobilidade, este efeito após um período de enfrentamento ativo, pode ter a função de conservação de energia para gasto em condições mais favoráveis, como já sugerido por outros autores (SANDRIN, 2002; VALENTIM; HOSHINO, 2006), ou ser manifestação de um estado depressivo que evoluiu filogeneticamente para tornar indiferente o sofrimento da morte em condições adversas extremas (HOSHINO, 2006). LSL não causou nenhum efeito depressor, uma vez que esta lectina não aumentou o tempo de

imobilização no teste de nado forçado, estes resultados asseguram que o efeito antinociceptivo observado não está relacionado a efeitos centrais.

Adicionalmente, LSL parece ser bem tolerada por esses animais, pois a avaliação da toxicidade sub-crônica em camundongos, com a dose utilizada para se obter o efeito antihiperálgico durante sete dias não provocou nenhuma alteração morfológica nos órgãos avaliados (rim, fígado, coração e estômago). Os parâmetros usados na avaliação da função renal e hepática também não foram alterados quando comparado ao grupo controle (salina). O número de leucócitos circulantes no sangue e a massa corporal dos animais mantiveram-se normais depois do tratamento agudo com a lectina.

O potencial terapêutico de drogas direcionadas contra a adesão entre leucócitos e endotélio para o tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas pode ser promissor. Nossos resultados demonstraram que a lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* não apresenta toxicidade e nem efeitos centrais. Além disso ela é capaz de inibir a hipernocicepção inflamatória em camundongos. Este efeito parece ser causado por uma ampla variedade de ações (inibição da migração de leucócitos, redução dos níveis de citocinas e quimiocinas e aumento na produção de óxido nítrico) após a administração do estímulo nociceptivo e/ou inflamatório. Estes resultados requerem fortemente mais investigações para o surgimento da possibilidade de uso da lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* para o tratamento de condições inflamatórias e da hipernocicepção inflamatória, ou ainda como ferramenta farmacológica para o melhor entendimento dos processos de inflamação e hiperálgia auxiliando o desenvolvimento de novas drogas.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

A Lectina de semenetes de *Lonchocarpus sericeus* (LSL) apresenta uma atividade antiinflamatória associada à inibição da migração de neutrófilos. Esta inibição ocorre pela redução do rolamento e adesão de neutrófilos que pode estar associada com a redução da síntese e/ou liberação de citocinas (IL-1 e TNF- α) e quimiocinas (CCL3 e CXCL1) e com aumento sistêmico nos níveis de óxido nítrico (NO). LSL também apresenta efeito antiinflamatório inibindo a migração induzida por agentes antigênicos como a ovalbumina. Entretanto, LSL parece não atuar diretamente nos neutrófilos para inibir a migração, uma vez que esta lectina foi incapaz de inibir a migração *in vitro* induzida por MIP-2.

No estudo da atividade antinociceptiva, LSL apresentou atividade no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético. No modelo de formalina esta atividade ocorre somente na segunda fase, sugerindo uma ação da LSL na fase inflamatória da dor, e este achado é reforçado pela ausência do efeito antinociceptivo central da LSL no modelo da placa quente. Na investigação da atividade desta lectina sobre a fase inflamatória da dor, LSL apresentou atividade antihiperálgica em modelo de hiperálgia mecânica estimulada por carragenina e ovalbumina, mas não por prostaglandina E₂. Este efeito também está relacionado com inibição da migração de neutrófilos e com a inibição da síntese e/ou liberação de citocinas (IL-1 e TNF- α) e quimiocinas (CCL3 e CXCL1). Além disso, a atividade antinociceptiva da LSL pode também envolver a participação de NO.

Adicionalmente, LSL administrada de forma intravascular não provoca depressão e não altera atividade locomotora dos animais (comprovando sua atividade periférica). LSL quando administrada de forma aguda durante sete dias não promove alterações hepáticas e renais, nem no perfil leucocitário sanguíneo e no peso corporal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDERTON, W.K.; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: Structure, function and inhibition. **Biochem. J.**, v. 357, p. 593-615, 2001.

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, p. 107-113, 1999.

ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; ALENCAR, V.B.M.; 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, p. 1674-1681, 2003

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

ALENCAR, N.M.N.; CAVALCANTE, C.F.; VASCONCELOS, M.P.; LEITE, K.B.; ARAGÃO, K.S.; ASSREUY, A.M.S.; NOGUEIRA, N.A.P.; CAVADA, B.S.; VALE, M.R. Anti-inflammatory and anti-microbial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental model of infectious peritonitis. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 57, 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, 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, p. 375-381, 2005c.

ALENCAR, V.B.M.; BRITO, G.A.C.; ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.S.; PINTO, V.P.T.; TEIXEIRA, E.H.; SOUZA, E.P.; DEBRAY, H.; RIBEIRO, R.A.; CAVADA, B.S. *Helianthus tuberosus* agglutinin directly induces neutrophil migration, which can be modulated/inhibited by resident mast cells. **Biochem. Cell. Biol.**, v. 83, p. 659-666, 2005d.

ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.; HAVT, A.; BENEVIDES, R.G.; DE MOURA, T.R.; DE SOUSA, R.B.; RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q.; CAVADA, B.S. *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotactic mediators. **Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol**, v. 374, p. 275-282, 2007.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res.**, v.1000, p.40-56, 2004.

ALTIER, C.; ZAMPONI, G. W. Targeting Ca^{2+} channels to treat pain: T-type versus N-type. **Trends Pharmacol Sci**, v.25, n.9, p. 465-70. 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, p. 98-102, 1999.

ANDRADE, C.A.; CORREIA, M.T.; COELHO, L.C.; NASCIMENTO, S.C.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S. Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. **Int J Pharm.**, v. 8, p. 435-445, 2004.

ASSREUY, A.M.S.; SHIBUYA, M.D.; MARTINS, G.J.; SOUZA, M.L.P.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators Inflamm.**, v. 6, p. 201-210, 1997.

ASSREUY, A.M.S.; MARTINS, G.J.; MOREIRA, E.E.F.; BRITO, G.A.C.; CAVADA, B.S.; RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A. Prevention of Cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. **J. Urol.** v.161, p. 1988-1993, 1999.

AZEVEDO-TOZZI, A. M. G. Estudos taxonômicos dos gêneros *Lonchocarpus* Kunth e *Deguelia* Aubl. no Brasil. Tese de Doutorado, Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 1989.

BAEZ S. Simultaneous measurements of radii and wall thickness of microvessels in the anesthetized rat. **Circ. Res.**, v. 25, p. 315–329, 1969.

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, p. 297-303, 1992.

BASBAUM, A. I.; JESSELL, T. M. A percepção da dor. In: Kandel, E. R.; Schwartz, J.

H.; Jessen, T. M. Princípios da neurociência. Barueri, SP: Manole, p.472-491, 2003.

BAUHMANN, H., GAUDIE, J. The acute phase response. **Immunol. Today**, v. 15, p. 74-80, 1994.

BEHBEHANI, M. M.; FIELDS, H. L. Evidence that an excitatory connection between the periaqueductal gray and nucleus raphe magnus mediates stimulation produced analgesia. **Brain Res**, v.170, n.1, p.85-93. 1979.

BESSON, M. J.; DICKENSON, A. The pharmacology of pain. Berlin: Springer-Verlag., v.130, p. 21-41, 1997.

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, p. 1-6, 1995.

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

BILLIAU, A. MATTHYS, P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. **J. Leuk. Biol.**, v. 70, p. 849-860, 2001.

BITENCOURT, F.S.; FIGUEIREDO, J.G.; MOTA, M.R.; BEZERRA, C.C.; SILVESTRE, P.P.; VALE, M.R.; NASCIMENTO, K.S.; SAMPAIO, A.H.; NAGANO, C.S.; SAKER-SAMPAIO, S.; FARIAS, W.R.; CAVADA, B.S.; ASSREUY, A.M.; ALENCAR, N.M. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** v. 377, n. 2, p. 139-148, 2008.

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

BOYDEN, S.; The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.*, v. 115, p. 543-466, 1962.

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

CAILLIET, R. Dor: Mecanismos e tratamentos. Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul LTDA, p. 274-284, 1993.

CAPAZ, F.R.; VASCONCELLOS, L.E.; DE MORAES, S.; NETO, J.P. The open field: a simple method to show ethanol withdrawal symptoms. **Arc. Int. Farmacodyn. Ther.**, v. 251, p. 228-236, 1981.

CARVALHO, J.T.C.; TEIXEIRA, J.R.M.; SOUZA, P.J.C.; BASTOS, J.K.; FILHO, D.S.; SARTI, S.J. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **J. Ethnopharm.**, v. 53, p. 175-178, 1996.

CAVAILLON, J.M. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: Myth or reality. **Cell. Mol. Biol.**, v. 47, p. 695-702, 2001

CAVUN, S.; GOKTALAY, G.; MILLINGTON, W.R. The hypotension evoked by visceral nociception is mediated by delta opiod receptors in the periaqueductal gray. **Brain Reseach**, v. 1019, p. 237-245, 2004.

CERVERO, F. Mechanisms of visceral pain. Pain – An Updated Review. **IASP Press**, Seattle, 2002.

CHAN, G.H; FISCUS, R.R. Exaggerated production of nitric oxide (NO) and increases in inducible NO-synthase mRNA levels induced by the pro-inflammatory cytokine interleukin-1beta in vascular smooth muscle cells of elderly rats. **Exp. Gerontol.**, v. 39, p. 378-394, 2004.

CHEN, J.C.; CHEN, H.M.; SHRY, M.H.; FAN, L.L.; CHI, T.Y.; CHI, C.P.; CHEN, M.F. Selective inhibition of inducible nitric oxide in ischemia-reperfusion of rat small intestine. **J. Formos Med. Assoc.**, v. 99, p. 213–218, 2000.

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

CHERNOV, H.I; WILSON, D.E.; FOWLER, F.; PLUMMER A.J. Non-specificity of de mouse writhing test. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v. 167, p. 171-178, 1967.

CIRINO, G.; FIORUCCI, S.; SESSA, W.C.; Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 2, p. 91-94, 2003.

COLLIER, H.O.J.; DINNEEN, L.C.; JOHNSON, C.A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br. J. Pharmacol. Chemother.**, v.32, p. 295-310, 1968.

CRAIG, A.D.; DOSTROVSKY, J.O. Medulla to thalamus. In: **Textbook of pain**. Churchill Livingstone, London: P. D. M. Wall, R, p.183-214, 1999.

CRONSTEIN, B.N.; WEISSMAN, G. The adhesion molecules of inflammation. **Arthritis Rheum.**, v. 136, p. 147-157, 1993.

CUNHA, F.Q.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **Br. J. Pharmacol.**, v. 104, p. 765–767, 1991.

CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. The pivotal role of tumor necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v. 107, p. 660–664, 1992a.

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

CUNHA, J.M.; SACHS, D.; CANETTI, C.A.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. The critical role of leukotriene B4 in antigen-induced mechanical hyperalgesia in immunised rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 139, p. 1135-1145, 2003a.

CUNHA, G.M.A.; FONTENELE, J.B.; NOBRE-JUNIOR, H.V.; MARTINS-DESOUSA, F.C.; SILVEIRA, E.R.; NOGUEIRA, N.A.P.; MORAES, M.O.; VIANA, G.S.B.; COSTA-LOTUFO, L.V. Cytotoxic activity of chalcones isolated from *Lonchocarpus sericeus* (Poir.) Kunth. **Phytother. Res.** v. 17, p. 155-159, 2003b.

CUNHA, T.M.; VERRI, W.A. JR.; SILVA, J.S.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 102, p. 1755-1760, 2005.

DAVIS, K.D.; MEYER, R.A.; COHEN, R.H.; CAMPBELL, J.N. Mechanically-insensitive nociceptors in the primate. **Soc. Neurosc. Abst.**, v. 15, p. 440, 1989.

DETKE, M.J.; JOHNSON, J.; LUCKI, I. Acute and chronic antidepressant drug treatment in the rat forced swimming test model of depression. **Exp.Clin. Psychophar.**, v. 5, p. 107-112, 1997.

DJOUHRI, L.; LAWSON, S.N. Ab-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to the other afferent A-fiber neurons in mammals. **Brain Research Reviews**, v. 46, p.131-145, 2004.

DOUBELL, T. P.; MANNION, R. J.; WOOLF, C. J. The dorsal horn: state-dependent sensory processing, plasticity and the generation of pain. In: Churchill Livingstone. **Textbook of pain**. London: P.D. Wall; R. Melzack, p. 165-81, 1999.

DUARTE, I.D.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, S.H. Participation of sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. *Bras. J. Med. Biol. Res.* 21: 341, 1988.

DUARTE, I.D.; DOS SANTOS, I.R.; LORENZETTI B.B. Analgesia by direct antagonism of nociceptor sensitization involves the arginine-nitric oxide cGMP pathway. **Eur. J. pharmacol.**, v. 217, n. 2-3, p. 225-234, 1992.

DUCKE, A. Plantas novas ou pouco conhecidas da região amazônica III. **Archos. Jard. Bot. RJ.** v. 4, p. 1-90, 1925.

DUCKE, A. Notas sobre a Flora Neotropical – II. As leguminosas da Amazônia brasileira. **Bolm. Téc. Inst. Agron. N.** v. 18, p. 171-200, 1949.

DUCKE, A. As leguminosas de Pernambuco e Paraíba. **Mems. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 51, p. 417-446, 1953.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurologic deficit in rats and mice. **J. Neurosci.**, v.19, p. 3423-3429, 1957.

DWORKIN, R H.; BACKONJA, M.; ROWBOTHAM, M. C.; ALLEN, R R; ARGOFF, C. R; BENNETT, G. J.; BUSHNELL, M. C.; FARRAR, J. T.; GALER, B. S.; HAYTHORNTHWAITE, J. A.; HEWITT, D. J.; LOESER, J. D.; MAX, M. B.; SALTARELLI, M.; SCHMADER, K. E.; STEIN, C.; THOMPSON, D.; TURK, D. C.; WALLACE, M. S.; WATKINS, L R.; WEINSTEIN, S. M. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. **Arch Neurol**, v. 60, n.11, p.1524-34. 2003.

EDDY, N.B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. LI dithienylbutenyl and dithienylbutylamines, **J. Pharmacol. Exper. Ther.**, v. 107, p. 385-393, 1953.

EISERICH, J.P.; PATEL, R.P.; O'DONNELL, V.B.O. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecule. **Molec. Aspects Med.**, v. 19, p. 221-357, 1998.

ELBEIN, A. D.; MITCHELL, M.; SANFORD, B. A.; FELLOWS, L. E.; EVANS, S. V. The pyrrolidine alkaloid, 2,5-dihydroxymethyl-3,4-dihydroxypyrrolidine, inhibits glycoprotein processing. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 12409-12413, 1984.

ELSNER, J.; HOCHSTETTER, R. Human eotaxin represents a potent activator of the respiratory burst of human eosinophils. **Eur. J. Immunol.**, v. 26, n. 8, p. 1919-1925. 1996.

ELSNER, J.; H. PETERING.; KULTHE, C.; KIMMING, D.; SMOLARSKI, R.; PONATH, P.; KAPP, A. Eotaxin-2 activates chemotaxis-related events and release of reactive oxygen species via pertussis toxin-sensitive G proteins in human eosinophils. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, n. 7, p. 2152-2158. 1998.

EVANS, W. C. A taxonomic approach to the study of medicinal plants and animal-derived drugs. In: _____. **Trease and Evans' Pharmacognosy**. London, 15a ed., Ed. W. B. Saunders, 2002, cap. 5, p. 15-40.

FACCIOLI, L. H., SOUZA, G. E., CUNHA, F.Q., POOLE, S. AND FERREIRA, S.H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms. **Agents Actions**, v. 30, p. 344, 1990

FEIZI, T. Oligosaccharides that mediate mammalian cell-cell adhesion. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 3, p. 701-710, 1993.

FERREIRA, S.H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nat. New. Biol.**, v. 240, n. 102, p. 200, 1972.

FERREIRA, S.H.; NAKAMURA, M.; DE ABREU CASTRO, M.S. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E2. **Prostaglandins**, v. 16, p. 31-37, 1978a.

FERREIRA, S.H.; ZANIN, T.; LORENZETTI, B.B.; DE SOUZA, M.Z.; MEDEIROS M.C.; LEME, J.G. Increased vascular permeability, oedema and hyperalgesia caused by carrageenan in the rat's paw. **Agents Actions**, v. 8, p. 159, 1978b.

FERREIRA, S.H. Are macrophages the body's alarm cells. **Agents and actions**, v. 10, p. 229, 1980.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; BRISTOW, A.F.; POOLE, S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. **Nature**, n. 334, p. 698-700, 1988.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; DE CAMPOS, D.I. Induction, blockade and restoration of a persistent hypersensitive state. **Pain**, v. 42, n. 3, p. 365, 1990.

FERREIRA, S.H.; DUARTE, I.D.; LORENZETTI, B.B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 201, p. 121-129, 1991.

FERREIRA, S. H. The role of interleukins and nitric oxide in the mediation of inflammatory pain and its control by peripheral analgesics **Drugs**, v. 46, Suppl 1, p. 1, 1993a.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **Br. J. Pharmacol.**, v.110, p.1227-31. 1993b.

FIGARELLA-BRANGER, D.; CIVATTE, M.; BARTOLI, C.; PELLISSIER, J.F. Cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules in inflammatory myopathies. **Muscle Nerve.**, v. 28, n. 6, p. 659-682, 2003.

FOLLENFANT, R.L., NAKAMURA, M.; GARLAND, L.G. Sustained Hyperalgesia in rats evoked by the protein kinase inhibitor H-7. **Br. J. Pharmacol.**, v. 99, p. 289, 1990.

FORTES, Z.B.; FARSKY, S.P.; OLIVEIRA, M.A.; GARCIA-LEME, J. Direct vital microscopic study of defective leukocyte–endothelial interactions in diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 40, p. 1267-1273, 1991.

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.

FREUND, J. The mode of action of immuno-pharmacological adjuvants. **Adv. Tuberc. Res.**, v. 1, p. 130–148, 1956.

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, p. 185-194, 2005.

GAO, X.; ZHANG, Y.a.; WU, G.C. Effects of dopaminergic agents on carrageenan hyperalgesia after intrathecal administration to rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v.418, p.

73-77, 2001.

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

GOMES, J.C.; FERREIRA, R.R.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans: comparison with concanavalin A. **Ag. Actions.**, v. 41, p. 132-135, 1994.

GRAEFF, M. Neurofisiologia da dor. Drogas psicotrópicas e seu modo de ação, São Paulo: EPU-EDUSP, CNPq, 1984.

GRANGER D.N.; BENOIT J.N.; SUZUKI M.; GRISHAM M.B. Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia–reperfusion, **Am. J. Physiol.**, v. 257, p. 683-688, 1989.

GRANGER, D.N.; KUBES, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. **J. Leuk. Biol.**, v. 55, p. 662-675, 1994.

GRANJEIRO, T.B. Clonagem, sequenciamento e expressão do gen da lectina (Con Br) de sementes de *Canavalia brasiliensis*. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (tese de doutorado). UFC, 1996.

GREENBERG, S.S.; OUYANG, J.; ZHAO, X.; GILES, T.D. Human and rat neutrophils constitutively express neural nitric oxide synthase mRNA. **Nitric Oxide**, v. 2, p. 203-212, 1998.

GUYTON A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

HAMA, A.; MENZAGHI, F. Antagonist of nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) enhances formalin-induced nociception in rats: tonic role of nAChRs in the control of pain following injury. **Brain Res.**, v. 888, p. 102–106. 2001.

HANDWERKER, H.O.; KILO, S.; REEH, P.W. Afferent C-fibres from rat hairy skin not driven by natural stimulation. **Soc. Neurosc. Abst.** 15: 1265, 1989.

HONG, Y.; ABBOTT, F.V. Contribution of peripheral alpha 1A-adrenoceptors to pain induced by formalin or by alpha-methyl-5-hydroxytryptamine plus noradrenaline. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 301, p. 41–48, 1996.

HOSHINO, K. A perspectiva biológica do luto. **Comportamento e Cognição**, v. 17, p. 313-326, 2006.

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.1785-1792, 2003.

HUNSKAAR, A.T.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103–4, 1987.

HUNSKAAR, S.; BERGE, O.G.; HOLE, K. A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics. **Behav. Brain Res.**, v.21, p.101-108, 1996.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesia. **J. Neurosci. Methods.**, v. 14, p. 69–76, 1985.

IALENTI, A.; IANARO, A.; MAFFIA, P.; SAUTEBIN, L.; DI ROSA, M. Nitric oxide inhibits leukocyte migration in carrageenan-induced rat pleurisy. **Inflamm. Res.**, v. 49, p. 411–417, 2000.

IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H.; OH-ISHI; Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sci.**, v.69, p. 2911-2919, 2001.

IGNARO, L.J.; BUGA, G.M.; WOOD, K.S.; BYRNS, R.E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 84, p. 9265-9269, 1987.

INTERNATIONAL LEGUME DATABASE & INFORMATION SERVICE –Reported generated by Legume web from the ILDIS World Database of legumes, version 6.05 <<http://www.ildis.org/LegumeWeb>> acesso em 19 junho 2008.

JONES, A.K.; AL-JANABI, M.A.; SOLANKI, K.; SOBNACK, R.; GREENWOOD, A.; DOYLE, D.V.; BRITTON, K.E.; HUSKISSON, E.C. In vivo leukocyte migration in arthritis. **Arthritis Rheum.**, v. 34, p. 270–275, 1991.

JOURDAN, D.; ARDID, D.; BARDIN, L.; BARDIN, M.; NEUZERET, D.; LANPHOUTHACOUL, L.; ESCHALIER, A.A. New automated method of pain scoring in the formalin test in rats. **Pain**, v. 71, p. 265–270, 1997.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p.203-10. 2001.

KAKINUMA, T.; HWANG, S.T.; Chemokines, chemokine receptor, and cancer metastasis. **J. Leukoc. Biol.**, v. 79, n. 4, p. 639-651, 2006.

KANSAS, G.S. Selectins and their ligands: Current concepts and controversies. **Blood**. v. 88, p. 3259-3287, 1996.

KAPLAN, A.P. Chemokines, chemokine receptors and allergy. **Int Arch Allergy Immunol.**, v. 124, n. 4, p. 423-31, 2001.

KAPP, A.; ZECK-KAPP G.; CZECH, W.; SCHOPF, E. The chemokine RANTES is more than a chemoattractant: characterization of its effect on human eosinophil oxidative metabolism and morphology in comparison with IL-5 and GM-CSF. **J. Invest. Dermatol.**, v. 102, n. 6, p. 906-914. 1994.

KARABUCAK, B.; WALSCH, H.; JOU, Y.T.; SIMCHON, S.; KIM, S.. The role of endothelial nitric oxide in the substance P induced vasodilation in bovine dental pulp. **J. Endod.**, v. 31, p. 733-736, 2005.

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. 295-305, 2007.

KIDD, B. L.; URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. **Br J Anaesth**, v.87, n.1, p.3-11. 2001.

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

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DEBEER, E.J. Acetic-acid for analgesic screening. **Fed. Proc.**, v. 18, p. 412-417, 1959.

KUBES, P.; SUZUKI, M.; GRANGER, D.N. Nitric Oxide : An endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 88, p. 4651-4655, 1991.

KULBE, H.; LEVINSON, N.R.; BALKWILL, F.; WILSON. J.L. The chemokine network in cancer-much more than directing cell movement. **Int. J. Dev. Biol.** v. 48, n.6, p. 489-496, 2004.

LAINE, R.A. A calculation of all possible oligosaccharide isomer, both branched and linear yields 1.05×10^{12} structures or a reducing hexasaccharide: the isomer barrier to develop of single method saccharide sequencing or synthesis systems. **Glycobiology**, v. 4, n. 19, 1994.

LAING, K.J.; SECOMBES, C.J. Chemokines. **Dev. Comp. Immunol.**, v. 28, n. 5, p. 443-60, 2004.

LANSEN, G.L.; HENSON, P.M. Mediators of inflammation. **Rev. Immunol.**, v. 1, p. 335-359, 1993.

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

LEE, Y.; LEE, C. H.; OH, U. Painful channels in sensory neurons. **Mol Cells**, v.20, n.3, p.315-24. 2005.

LIAUDET, L.; SORIANO, F.G.; SZABÓ, C. Biology of nitric oxide signaling. **Critic. Care Med.**, v. 26, p. 37-52, 2000.

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. **J. Pharm Pharmacol.**, v. 56, p. 1415-1421, 2004.

LIOTTA, L.A. An attractive force in metastasis. **Nature**, v. 241, p. 24-25, 2001.

LORENZETTI, B.B.; VEIGA, F.H.; CANETTI, C.A.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant1 (CINC-1) mediates the sympathetic component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats. **Eur Cytokine Netw.**, v. 134, p. 456-461, 2002.

LUCKI, I. The forced swimming test as a model for core and component behavioral effects of antidepressant drugs. **Behavioral Pharm.**, v. 8, p. 523-532, 1997.

LUSTER, A.D. Chemokines-chemotactic cytokines that mediated inflammation. **N. Engl. J. Med.**, v. 338, n. 7, p. 436-445, 1998.

MA, H.C.; DOHI, S.; WANG, Y.F.; ISHIZAWA, Y.; YANAGIDATE, F. The antinociceptive and sedative effects of carbachol and oxycodone administered into brainstem pontine reticular formation and spinal subarachnoid space in rats. **Anesth. Analg**, v. 92, p. 1307-1315, 2001.

MACHADO, A.B.M. **Neuroanatomia funcional**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1988.

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

MALCANGIO, M.; BOWERY, N. G. GABA and its receptors in the spinal cord. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.17, n.12, p.457-62. 1996.

MALECH, H.L.; GALLIN, J.I. Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. *N. Engl. J. Med.*, v. 317, p. 687–694, 1987.

MARTINS DE SOUSA, F. C. Aspectos químicos do estudo químico-farmacológico de plantas do nordeste: *Myracrodruon urundeuva* (Fr. All.), *Lonchocarpus sericeus* (Poir.) Kunth e *Stachytarpheta* sp. Dissertação de mestrado, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ce, 2003.

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.

McCARTNEY-FRANCIS, N.L.; ALLEN, J.B.; MIZEL, D.E.; ALBINA, J.E.; XIE, Q.W.; NATHAN, C.F.; WAHL, S.M. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. **J. Exp. Med.**, v. 178 p. 749-754, 1993.

McCARTNEY-FRANCIS, N.L.; SONG, X.-Y.; MIZEL, D.E.; WAHL, S.M. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates erosive joint disease. **J. Immunol.**, v. 166, p. 2734–2740, 2001.

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

MCMAHON, S. B.; KOLTZENBURG, M. Novel classes of nociceptors: beyond Sherrington. **Trends Neurosci.**, v. 13, p. 199, 1990.

MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, v. 150, n. 699, p. 971-9. 1965.

MELZACK, R.; LOESER, J.D. Pain: an overview. **Pain**, v. 353, p.1607-1609, 1999.

MENEZES, R. A. Neuroanatomofisiologia da Dor. IN: MENEZES, R. A. (org.). Síndromes Dolorosas – Diagnóstico-Terapêutico – Saúde Física e Mental. Rio de Janeiro: Editora Revinter, p.9-19, 1999.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol.**, v. 57, p. 1-64, 1999.

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

MOORE, P.K.; OLUYOMI, A.O.; BABEDGGE, R.C. L-NG-nitro arginina methyl ester exhibits antinociceptive activity in mouse. **Br. J. Pharmacol.**, v. 102, n. 1, p. 198, 1991.

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

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

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

MURDOCK, L.L., HUESING, J.E., NIELSEN, S.S., PRATT, R.C., and SHADE, R.E. Biological effects of plant lectins on the cowpea weevil. **Phytochemistry**, v. 29, p. 85-89, 1990.

MURPHY, P.M. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis, **N. Engl. J. Med.**, v. 345, n. 11. p. 833-835, 2001.

NAKAMURA, M.; FERREIRA, S.H. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 135, n. 2, p. 145, 1987.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. *Nature*, v. 420, p. 846-852, 2002.

NESS, T. J.; GEBHART, G.F. Visceral pain: a review of experimental studies. **Pain**, v. 41, p. 167-234, 1990.

NEVES, S.A.; FREITAS, A.L.P.; SOUZA, B.W.S.; ROCHA, M.L.A.; CORREIA, M.V.O.; SAMPAIO, D.A.; VIANA, G.S.B. Antinociceptive properties in mice of a lectin isolated from the marine alga *Amansia multifida* Lamouroux. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 40, p. 127-134, 2007.

NIV, D.; KREITLER, S. Pain and Quality of life. **Pain Practice**, v.1, p.150-161, 2001.

OTTENSOOSER, F.; NAKAMIZO, Y.; SATO, M.; MIYAMOTO Y.; TAKIZAWA, K. Lectins detecting groups C streptococci. **Infection and Immunology**, v. 9, p. 971-973, 1974.

PALMER, R.M.; ASHTON, D.S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v. 16, p. 664-666, 1988.

PANÉS, J.; PERRY, M.; GRANGER, D.N. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. **Br. J. Pharmacol.**, v. 126, p. 537-550, 1999.

PARADA, C.A.; TAMBELI, C.H.; CUNHA F.Q.; FERREIRA, S.H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neurosc.**, v. 102, p. 937-944. 2001.

PAUL-CLARK, M.J.; GILROY, D.W.; WILLIS, D.; WILLOUGHBY, D.A.; TOMLINSON, A. Nitric oxide synthase inhibitors have opposite effects on acute inflammation depending on their route of administration. **J. Immunol.**, v. 2, p. 1169-1177, 2001.

PERRETTI, M.E.R.; FLOWER, J. Modulation of IL-1-induced neutrophil migration by dexamethasone and lipocortin 1. **J. Immunol.**, v. 150, p. 992-999. 1993.

PETERING, H.; HOCHSTETTER, R.; KIMMING, D.; SMOLARSKI, R.; KAPP, A.; ELSNER, J. Detection of MCP-4 in dermal fibroblasts and its activation of the respiratory burst in human eosinophils. **J. Immunol.**, v.160, n.2, Jan 15, p.555-8. 1998.

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

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. In: **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, p. 199-228, 1998.

PHILIP, M.; ROWLEY, D.A.; SCHEREIBER, H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. In: *Seminars in Cancer Biology*, v.14, p. 433-439, 2004.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Ministério da agricultura, Rio de Janeiro – GB, 1974, vol. V, p. 384.

PIOVEZAN, A.P.; D'ORLEANS-JUSTE, P.; FRIGHETTO, M.; SOUZA, G.E.; HENRIQUES, M.G.; RAE, G.A. Endothelins contribute towards nociception induced by antigen in ovalbumin-sensitised mice. **Br. J. Pharmacol.**, v. 141, p. 755-763, 2004.

PORRECA, F.; MOSBERG, H.I.; OMNAS, J.R.; BURKS, T.F.; COWAN, A. Supraspinal and spinal potency of selective opioid agonists in the mouse writhing test. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.240, p. 890-894, 1987.

PORTO, C.C. **Exames Clínicos: Base para a Prática Médica**. 5 ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 37-40, 2004,.

RAINVILLE, P. Brain mechanisms of pain affect and pain modulation. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v.12, p.195-204, 2002.

RAJA, S. N.; MEYER, R.A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J. N Peripheral neural mechanisms of nociception. In: Textbook of pain . Churchill Livingstone, London: P. D. M. WALL, R. p 11-57, 1999.

RANG, H.P.; BEVAN, S.; DRAY, A. Chemical activation of nociception peripheral neurons. **Br. Med. Bull.**, v. 47, n. 3, p. 534, 1991

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Pharmacology**. 5 ed., São Paulo: Elsevier, 2003.

RHODIN J.A.G. Architecture of the vessel wall, in: D.F. Bohr, A.P. Somlyo, H.V. Sparks (Eds.), Handbook of Physiology: The Cardiovascular System, Bethesda, v. II, p. Md 1–31, 1986.

RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. IL-8 cause in vivo neutrophil migration by a cell dependent mechanism. **Immunology**, v. 73, p. 472-477, 1991.

RIBEIRO, R.A.; SOUZA-FILHO, M.V.P.; SOUZA, M.H.L.P.; OLIVEIRA, S.H.P.; COSTA, C.H.S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H.P. Role of resident mast cells and macrophages in the neutrophil migration induced by LTB₄, fMLP and C5a des arg. **Int. Arch. Allergy. Immunol.**, v. 112, p. 27-35, 1996.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; THOMAZZI, S.M.; PASCHOALATO, A. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zimosan and acetic acid in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 387, p.111-118, 2000.

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Rheumatol.**, v. 60, n. 6, p. 404-15. 2001.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. As Bases Patológicas das Doenças. Cap 3: Inflamação e reparo. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 48-79, 2005.

ROCHA, J.C.S.; PEIXOTO, M.E.B.; JANCAR, S.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A.; ROCHA, F.A.C. Dual effect of nitric oxide in articular inflammatory pain in zymosan-induced arthritis in rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 136, p. 588-596, 2002.

ROLLINS, B. J. Chemokines. **Blood**, v. 90, n. 3, p. 909-928, 1997.

ROSEN, S.D.; BERTOZZI, C.R. The selectins and their ligands. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 6, p. 663-673, 1994.

ROSSITER, H.; ALON, R.; KUPPER, T.S. Selectins, T-cell rolling and inflammation. **Molecular Med Today**, p. 214-222, 1997.

SANDRIN, M. F. N. Densidade populacional e padrões comportamentais do hamster sírio *Mesocricetus auratus* (Waterhouse, 1839) (Rodentia: muridae) no nado forçado. Tese de doutorado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP. 2002.

SANTI-GADELHA, T.; GADELHA, C.A.; ARAGÃO, K.S.; OLIVEIRA, C.C.; MOTA, M.R.L.; GOMES, R.C.; DE FREITAS, P.A.; TOYAMA, M.H.; DE OLIVEIRA, T.D.; ALENCAR, N.M.N.; CRIDDLE, D.N.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S.; Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seeds lectin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 350, p. 1050-1055, 2006.

SANTUCCI, L.; FIORUCCI, S.; GIANANTI, M.; BRUNORI, P.M.; DI MATTEO, F.M.; MORELLI, A.; Pentoxifylline prevents indomethacin induced acute gastric mucosal damage in rats: role of tumour necrosis factor alpha. **Gut**, v.35, p. 909-915, 1994.

SANZ-APARÍCIO, J.; HERMOSO, J.; GRANJEIRO, T.B.; CALVETE, J.J.; CAVADA, B.S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation

between its quaternary conformation and its distinct lectin biological properties from Concanavalin A. **FEBS Letters**, v 405, p. 114-118, 1997.

SCHMIDT, R.R. Stereochemistry of Organic and Bioorganic Transformations. Bartman, W. and Sharpless, K. B., Eds., VCH, Republic of Germany, p. 169-189, 1987.

SECCO, D.D.; MOREIRA, A.P.; FREITAS, A.; SILVA, J.S.; ROSSI, M.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Nitric oxide inhibits neutrophil migration by a mechanism dependent on ICAM-1: role of soluble guanylate cyclase. **Nitric Oxide**, v. 15, p. 77-81, 2006.

SÉRVULO, K.B.L.M. Isolamento, purificação, caracterização parcial e atividade biológica de uma lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus* (Leguminosae-papilionoidae-tribo tephrosieae). Tese de doutorado, Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará. 2004.

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

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain.**, v. 38, p. 347-352, 1989.

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

SICKER, T.; WUCHOLD, F.; KAISER, B.; GLUSA, E.. Systemic vascular effects of thrombin and thrombin receptor activating peptide in rats. **Thrombosis Res.**, v. 101, p. 467-475, 2001.

SIQUEIRA, J.R.; DANTAS, C.J.S. Mecanismos Celulares e Moleculares da Inflamação. Rio de Janeiro: **Medsa**, p. 238, 2000.

SODHI, A.; TARANG, S.; KESHERWANI, V. Concanavalin A induced expression of Toll-like receptors in murine peritoneal macrophages in vitro. **Int Immunopharmacol.**, v. 7, p. 454-463, 2007.

SOJA, P.J.; TAEPVARAPRUK, N.; PANG, W.; CAIRNS, B.E.; MCERLANE, S.A.; FRAGOSO, M.C. Transmission through the dorsal spinocerebellar and spinoreticular tracts: wakefulness versus thiopental anesthesia. **Anesthesiology**, v. 97, p. 1178-1188, 2002.

SOUZA, D.G.; CASSALI, G.D.; POOLE, S.; Effects of inhibition of PDE4 and TNF- α on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. **Br J Pharmacol**, v.134, p. 985–994, 1994.

SOUZA, G.E.P.; FERREIRA, S.H. Blockade Antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Ag. Actions**, v. 17, p. 97-103, 1985.

STOWE, D.F.; HEISNER, J.S.; CHUNG, W.W.; FUJITA, S.. Volatile anaesthetics restore bradykinin and serotonin-induced coronary vasodilation after blocking nitric oxide synthase: lack of anaesthetic effects on KATP channels and prostaglandin pathways. **Eur. J. Anaesthes.**, v. 18, p. 219-230, 2001.

SYRBE, U.; SIVEKE, J. Th1/Th2 subsets: distinct differences in homing and chemokine receptor expression? **Springer Semin Immunopathol**, v. 21, n. 3, p. 263-85, 1999.

TAKAHASHI, R.N.; PAZ, M.M. Influence of naloxone of analgesic effects of antidepressants in mice. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 20, p. 607-610, 1987.

TAKTAK, Y.S.; SELKIRK, S.; BRISTOW, A.F.; CARPENTER, A.; BALL, C.; RAFFERTY, B.; POOLE, S. Assay of pyrogens by interleukin-6 release from monocytic cell lines. **J. Pharmacol.**, v. 43, p. 578–582, 1991.

TEDDER, T.F.; STEEBER, D. A.; CHEN, A.; ENGEL, P. The selectins: vascular adhesion molecules. **Faseb J.**, v. 9, p. 866-873, 1995.

TEDGUI, M.; MALLAT, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. **Circul. Res.**, v. 88, p. 877-887, 2001.

TEXEIRA, M.J.; PIMENTA, C.A. M. Introdução: a evolução do conhecimento. In Limay. Dor: conceitos gerais. São Paulo: M. J. Teixeira, p. 3-7, 1994.

THOMAZZI, S. M. Participação de macrófagos e citosinas (TNF- α , IL-1 e IL-8) na modulação da nocicepção induzida no modelo de contorções abdominais. Dissertação de mestrado apresentada ao Depto. de Fisiologia e Farmacologia- UFC, 1996.

TITHERADGE, M.A. Nitric oxide in septic shock. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 1411, p. 437-455, 1999.

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

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

TONUSSI, C.R.; FERREIRA, S.H. Bradykinin-induce knee joint incapacitation involves bradykinin B2 receptor mediated hyperalgesia and bradykinin B1 receptor-mediated nociception. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 61, p. 326, 1997.

TREEDE, R D.; MEYER, R A.; RAJA, S. N.; CAMPBELL, J. N. Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. **Prog Neurobiol**, v. 38, n. A, p. 397- 421. 1992.

URBAN, M.O.; SMITH, D.J. Nuclei within the rostral ventromedial medulla mediating morphine antinociception from the periaqueductal gray. **Brain Res**, v. 652, n.1, p.9-16, 1994.

VALENTIM, M. G.; HOSHINO, K. Imobilidade no teste do nado forçado: depressão ou estratégia de sobrevivência? **Comportamento e Cognição**, v. 18, p. 286-291, 2006.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. G. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Res Brain Res Rev**, v. 46, n. 3, p. 295-309. 2004.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H.G. Prostaglandins and cicloxygenases in spinal. **Cord. Prog. Neurob.**, v. 64, p. 327-363, 2001.

VILCEK, J.; FELDMAN, M.; Historical review: cytokines as therapeutic and targets of therapeutics. **trends Pharmacologic sciences**. v.25, n. 4, p. 201-209, 2004.

WAGNER, J.G.; ROTH, R.A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacol., Rev.** v. 52, p. 349-374, 2000.

WEDMORE, C.V.; WILLIAMS, T.J. Control of vascular permeability by polymorphonuclear leukocytes in inflammation. **Nature**. v. 289, p. 646-650, 1981.

WHITE, M. Mediator of inflammation and the inflammatory process. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 103, p. 378-381, 1999.

WIESENFELD-HALLIN, Z.; HALLIN, R.G. The influence of the sympathetic system on mechanoreception and nociception. A review. **Hum. Neurobiol.**, v. 3, n. 1, p. 41, 1984.

WOTHERSPOON, F.; BROWNE, D.L.; MEEKING, D.R.; ALLARD, S.E.; MUNDAY, L.J.; SHAM, K.M.; CUMMINGS, M.H.. The contribution of nitric oxide and vasodilator prostanoids to bradykinin-mediated vasodilation in type 1 diabetes. **Diabetic Medicine**, v. 22, p. 697-702, 2005.

YEH, S.Y. Potentiation of pentazocine antinociception by triphenlenamine in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 35, p. 683-701, 1986.

YOKOYAMA, C.; TANABE, T.; Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxidase synthase and primary structure of enzyme. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 1665, p. 3746-3752, 1989.

YOSHIKAI, Y. Roles of prostaglandins and leukotrienes in acute inflammation caused by bacterial infection. **Current opinion infectious Diseases**, v. 14, p. 257-263, 2001.

YOUSIF, M.H.M. Histamine-induced vasodilation in the perfused kidney of STZ diabetic rats: Role of EDNO and EDHF. **Pharmacol. Res.**, v. 51 p. 515-521, 2005.

ZOLTNIK, A. Chemokines in neoplastic progression. **Semin. Cancer Biol.**, v. 14, n. 3, p. 181-185, 2004.

ANEXO

Lonchocarpus sericeus lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokine and chemokines production

Marcelo H. Napimoga^{a,b,*}, Benildo S. Cavada^c, Nylane M.N. Alencar^d,
Mário L. Mota^d, Flávio S. Bittencourt^d, José C. Alves-Filho^b, Renata Grespan^b,
Reginaldo B. Gonçalves^e, Juliana T. Clemente-Napimoga^a, Andressa de Freitas^b,
Carlos A. Parada^b, Sérgio H. Ferreira^b, Fernando Q. Cunha^b

^a Laboratory of Molecular Biology, University of Uberaba, Brazil

^b Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil

^c Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Brazil

^d Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Brazil

^e Department of Oral Diagnostics, Dentistry School of Piracicaba, University of Campinas, Brazil

Received 10 October 2006; received in revised form 28 January 2007; accepted 8 February 2007

Abstract

In this study, we tested the potential use of a lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds (LSL), to control neutrophil migration and inflammatory hypernociception (decrease of nociceptive threshold). Pretreatment of the animals intravenously (15 min before) with LSL inhibited neutrophil migration to the peritoneal cavity in a dose-dependent fashion confirmed by an inhibition of rolling and adhesion of leukocytes by intravital microscopy. We also tested the ability of the pretreatment with LSL to inhibit neutrophil migration on immunised mice, and it was observed that a strong inhibition of neutrophil migration induced by ovalbumin in immunized mice. Another set of experiments showed that pretreatment of the animals with LSL, inhibited the mechanical hypernociception in mice induced by the i.pl. injection of OVA in immunized mice and of carrageenan in naïve mice, but not that induced by prostaglandin E₂ (PGE₂) or formalin. This anti-nociceptive effect correlated with an effective blockade of neutrophil influx, as assessed by the hind paw tissue myeloperoxidase levels. In addition, we measured cytokines (TNF- α and IL-1 β) and chemokines (MIP-1 α [CCL3] and KC [CXCL1]) from the peritoneal exudates and i.pl. tissue. Animals treated with LSL showed inhibition of cytokines and chemokines release in a dose-dependent manner. In conclusion, we demonstrated that the inhibitory effects of LSL on neutrophil migration and mechanical inflammatory hypernociception are associated with the inhibition of the production of cytokines and chemokines.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Lectin; Nociception; Inflammation; Neutrophil; Cytokines

* Corresponding author. Laboratory of Molecular Biology, University of Uberaba, Av. Nené Sabino, 1801, Uberaba, Minas Gerais 38055-500, Brazil. Tel.: +55 34 3319 8913; fax: +55 34 3314 8910.

E-mail address: marcelo.napimoga@uniube.br (M.H. Napimoga).

1567-5769/\$ - see front matter © 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.intimp.2007.02.001

1. Introduction

Neutrophils are the main leukocyte sub type participating in organism defense, and its migration

from blood vessels into the tissue is a crucial process in the host-response against microorganism infections [1]. Although they have a protective role in inflammation, tissue damage is a deleterious consequence of the intense neutrophil migration as observed in immune inflammatory diseases [2].

The neutrophils are chemoattracted to sites of inflammation by several stimuli and the process is mainly mediated by chemotactic factors released by resident cells [3]. Cytokines, chemokines, eicosanoids, LTB₄ and C5a are among the major chemoattractant mediators to these cells [4–7]. They induce rolling and adhesion of neutrophils on endothelial cells, followed by their transmigration to the extravascular space [7]. The rolling, adhesion and transendothelial migration involves the participation of different families of adhesion molecules, including the selectins, integrins and immunoglobulin superfamily, respectively [8].

Certainly pain is an important symptom of inflammatory disease and is the principal reason by which patient with inflammatory disease look for specialized treatment. Following tissue injury and inflammation, nociceptors are sensitized in such a way that previously slight or ineffective stimulation becomes painful. The sensitization of primary afferent nociceptors is a common denominator of all kinds of inflammatory pain that leads to a state of hyperalgesia and/or allodynia in human, better described as hypernociception in animal models [9,10]. In fact, the term allodynia involves a change in the quality of a sensation, whether tactile, thermal, or of any other sort, where original modality is normally non-painful, but the response is painful [11]. Thus, there is a loss of specificity of a sensory modality. By contrast, hyperalgesia represents an augmented nociceptive response, where the quality is not altered. In allodynia, the stimulus and response modes differ, unlike the situation with hyperalgesia. In this sense, the majority of experimental tests do not differentiate allodynia from hyperalgesia since they do not allow detection of loss of specificity of a sensory modality, characteristic of allodynia. On the other hand, they permit to quantify an increase in the intensity of the nociceptive response, which we believe to be better described as hypernociception in animals models.

Hypernociception is induced by the direct action of inflammatory mediators such as prostaglandins and sympathetic amines, on the peripheral nociceptors [12–14]. These direct acting hyperalgesic mediators are ultimately released in the inflamed tissue following a cascade of cytokines by the resident and migratory cells: TNF- α is early released and stimulates the release of IL-6 and IL-1 β which triggers the eicosanoid release. TNF- α also

induces CINC-1 (rat IL-8 related chemokine) release that stimulated the sympathomimetic amines production [6,15,16]. Besides the nociceptive direct-acting mediators described above, there is evidence that endothelins [17,18], substance P [19] and LTB₄ [20] also sensitize the peripheral nociception.

Lectins constitute a group of widely distributed and structurally heterogeneous carbohydrate binding proteins that comprises distinct but evolutionary related families. Leguminosae lectins constitute a protein family with related amino acid sequences that may differ from each other strongly with respect to their carbohydrate-binding specificity [21]. Several lectins are recognized among the adhesion molecules that actively participate in those responses, such as the selectins (L-, P-, and E-selectin), the integrin CD11b/CD18 (Mac-1), CD31 (PECAM-1), and CD44 [22].

It has recently been shown that glucose–mannose and *N*-acetyl-glucosamine-binding plant lectins inhibit the neutrophil infiltration in different models of inflammation [23–25]. In this context, a *Lonchocarpus sericeus* seeds lectin (LSL) inhibited the inflammatory response in an infectious peritonitis model, by a competitive blockage with a common selectin carbohydrate ligand [26]. In the present study, we focused on a potential use of LSL lectin obtained from seeds of *Lonchocarpus sericeus*, as putative modulator of leukocyte migration and hypernociception. The mechanisms by which this lectin inhibits neutrophil migration and inflammatory hypernociception were also addressed.

2. Materials and methods

2.1. Lectin isolation

Lectin was obtained from seeds of *L. sericeus* as described by Alencar et al. [23]. Briefly, seeds of *L. sericeus* were purified by a combination of affinity (chitin-column) and ion-exchange chromatography (Mono-Q column), yielding a pure lectin checked by SDS-PAGE, MALDI-MALDITOF and partial N-terminal sequence. By SDS-polyacrylamide gel electrophoresis LSL yielded an electrophoretic pattern with an apparent molecular mass of 26 kDa for the lectin similar to the major band of *Vatairea macrocarpa* lectin (VML) [27] and by gel filtration chromatography an apparent molecular mass of 100 kDa indicating that probably the lectin is a tetramer (data not published). LSL binds specifically to *N*-acetylglucosamine residues and is endotoxin free.

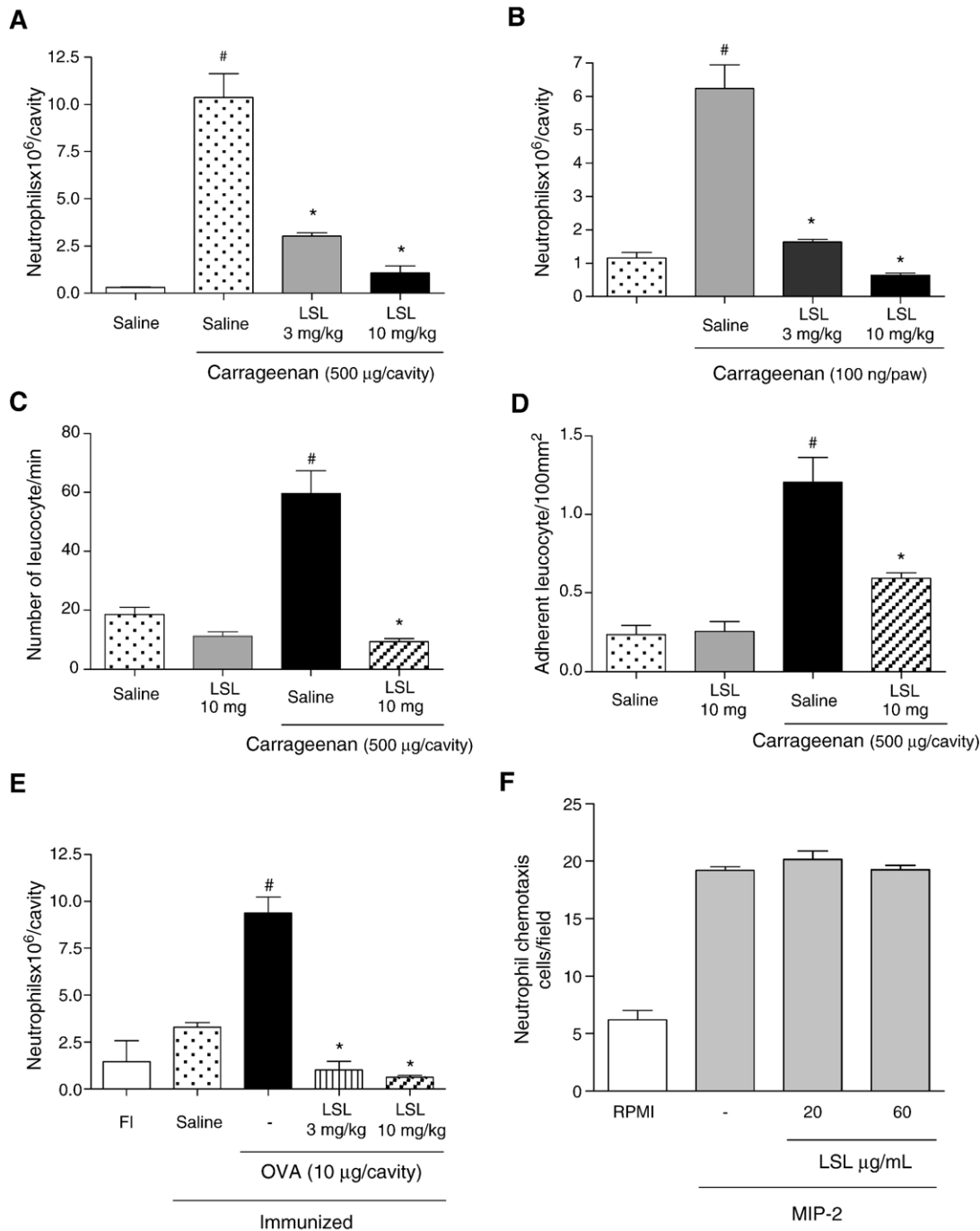
2.2. Animals

Male Balb/c mice (20–25 g) were housed in temperature-controlled rooms (22–25 °C) with access to water and food *ad*

libitum. All experiments were conducted in accordance with National Institutes of Health guidelines for the welfare of experimental animals and with the approval of the Ethics Committee of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto (University of São Paulo, São Paulo, Brazil). The animals were used only in a single experimental group.

2.3. Experimental procedure to evaluate neutrophil migration

For the determination of neutrophil migration to peritoneal cavity, LSL was administered i.v. 15 min before (3 or 10 mg/kg) the administration of inflammatory stimuli by intraperitoneal injection of carrageenan at 500 µg/cavity in naïve mice, or OVA



at 100 µg/cavity dissolved in PBS in immunized mice (see below for immunization procedures).

Mice were killed 4 h after the challenge (carrageenan or OVA) administration and the peritoneal cavity cells were harvested by washing the cavity with 3 mL of phosphate-buffered saline (PBS) containing EDTA 1 mM. The volumes recovered were similar in all experimental groups and equated to approximately 95% of the injected volume. Total counts were performed in a cell counter (COULTER A CT; Coulter, Miami, FL, USA) and differential cell counts (100 cells total) were carried out on cytocentrifuge (Cytospin 3; Shandon Lipshaw, Pittsburgh, Pennsylvania, USA) slides stained with Rosenfeld. The results are presented as the number of neutrophils per cavity.

The neutrophil migration to the i.p. hind paw by determination of myeloperoxidase activity (see below) after carrageenan injection was also evaluated. Mice were pretreated 15 min before with lectin solution i.v. at 3 and 10 mg/kg in a final volume of 100 µL. The animals received an i.p. injection of carrageenan (10 µg/paw; 25 µL) and neutrophil migration was measured after 3 h.

2.4. Determination of myeloperoxidase activity

The extent of neutrophil accumulation in the hind paw was measured by assaying myeloperoxidase activity as described elsewhere [28]. Briefly, the hind paw tissue was removed and homogenized in pH 4.7 buffer (0.1 M NaCl, 0.02 M NaPO₄, 1.015 M NaEDTA) followed by centrifugation at 3000 rpm for 15 min. The pellet was subjected to hypotonic lyses (1.5 mL of 0.2% NaCl solution followed 30 s later by addition of an equal volume of a solution containing NaCl 1.6% and glucose 5%). After further centrifugation, the pellet was resuspended in 0.05 M NaPO₄ buffer (pH 5.4) containing 0.5% hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB). After that, the tissue was snap-frozen in liquid nitrogen three times and was centrifuged at 10,000 rpm for 15 min and was re-homogenized. Myeloperoxidase activity in the resuspended pellet was assayed by measuring the change in optical density at 450 nm using tetramethylbenzidine (1.6 mM) and H₂O₂ (0.5 mM). Results were calculated by comparing the optical density of

hind paw tissue supernatant with a standard curve of neutrophil (>95% purity) numbers.

2.5. Determination of neutrophil rolling and adhesion to the mesenteric microcirculation by intravital microscopy

The leukocyte rolling and adhesion were examined as previously described [29,30]. Briefly, animals were anesthetized with hydrate chloride. The mesenteric tissue was exposed for microscopic examination *in situ*. This was performed through a longitudinal incision of the skin and abdominal muscle on the right side of the body followed by the exposure of the mesentery. Respiratory movements of the animals did not affect the preparation, and the microcirculatory characteristics remained essentially stable throughout the course of the experiment. The animals were maintained on a special board thermostatically controlled at 37 °C, with a transparent platform on which the tissue to be transilluminated was placed. The preparation was kept moist and warm by irrigating the tissue with warmed (37 °C) Ringer Locke's solution, pH 7.2–7.4, containing 1% gelatin. A 500-line television camera was mounted onto a triocular Zeiss microscope to facilitate observation of the enlarged image (3400×) on a video screen. Images were recorded on a video recorder with a 40× long distance objective and a 0.65 numerical aperture. An image-splitting micrometer was adjusted to the phototube of the microscope as described by Baez [29]. The image splitter sheared the optical image into two separate images and displaced one with respect to the other. By rotating the image splitter in the phototube, the shearing was maintained in a direction at right angles to the axis of the vessel. The displacement of one image from the others allowed measurement of the vessel diameter. Vessels selected for study were third-order venules, defined according to their branch-order location within the microvascular network. These vessels corresponded to postcapillary venules, with a diameter of 10 µm. The interaction of leukocytes with the luminal surface of the venular endothelium was studied in a segment of the vessel. Rolling leukocytes were defined as those white blood cells that moved at a velocity less than that of erythrocytes in the same stream. The number of rolling leukocytes was

Fig. 1. (A) The mice were treated with saline (0.1 mL, i.v.), or LSL (3 or 10 mg/kg, i.v., 15 min before) and then injected i.p. with carrageenan at a dose of 500 µg/cavity. The neutrophil migration was evaluated 4 h later. The white bars represent the neutrophil migration induced by saline injected i.p. The values are means±SD. **P*<0.05 compared to Carrageenan group; #*P*<0.05 compared to saline group (ANOVA followed by Bonferroni's *t*-test). (B) Effects of the pretreatment with LSL lectin on the influx of neutrophils into the hind paw of mice after carrageenan administration. Vehicle (saline) or LSL (3 or 10 mg/kg) was injected i.v. and, 15 min later, carrageenan (100 µg/paw; 0.25 mL) was injected into the hind paws. Myeloperoxidase activity in the hind paw was used as an index of neutrophil influx. Results are shown as the mean±SD. **P*<0.05 compared to Carrageenan group; #*P*<0.05 compared to saline group (ANOVA followed by Bonferroni's *t* test). The LSL treatment decreases leukocyte rolling and adhesion on venular endothelial cells. The mice were treated with saline (0.1 mL, i.v.) or LSL (10 mg/kg, i.v., 15 min before) and then injected with Cg (500 µg/cavity). The leukocyte rolling (C) and adhesion (D) were evaluated by intravital microscopy in the mesentery 4 h after Cg injection. The first bar in panels C and D represents the rolling and adhesion, respectively, in PBS i.p. injected animals. The values are means±SD. **P*<0.05 compared to carrageenan-injected group; #*P*<0.05 compared to saline group (ANOVA followed by Bonferroni's *t*-test). (E) Inhibition of OVA-induced neutrophil migration to peritoneal cavity by LSL in immunized mice. Immunized (IM) animals were treated with saline (i.v.; 15 min before) or LSL (3 or 10 mg/kg; i.v.; 15 min before) and false immunized animals were challenged i.p. with OVA (10 µg /cavity) and neutrophil migration was determined 4 h later. Data are mean±SD. **P*<0.05 compared to OVA-injected group; #*P*<0.05 compared to PBS i.p. group (ANOVA followed by Bonferroni's *t*-test). (F) Chemotaxis assay of mice neutrophils incubated in the presence of LSL. Cells were allowed to migrate in the Boyden chamber toward the medium alone or MIP-2. Cells were pre-incubated with different concentrations of LSL. Data show means±SD from three independent experiments performed in triplicate.

determined in 10-min intervals. These leukocytes moved sufficiently slow as to be individually visible and were counted as they rolled past a 10- μ m length of venule [30]. A leukocyte was considered to be adherent to the venular endothelium if it remained stationary for >30 s [31]. Adherent cells were expressed as the number per 10-im length of venule. Cells were counted in the recorded image using five different fields for each animal to avoid variability due to sampling. Data were then averaged for each animal.

2.6. Procedures for active immunization

OVA was dissolved in PBS to an appropriate concentration (100 μ g) and mixed with an equal volume of complete Freund's adjuvant (CFA). CFA was used to augment the efficiency of the immunization procedure [32] by prolonging the lifetime of injected autoantigen and by stimulating its effective delivery to the immune system; this results in altered leukocyte proliferation and differentiation [33]. Mice were subsequently injected subcutaneously at two different sites on their back with an emulsion containing an equal volume of PBS plus IFA to reforce the immunization at day 7 and 14. False immunized mice were injected with this emulsion without OVA. After 21 days, mice were challenged by the intraperitoneal (i.p) administration of OVA (at 10 μ g/cavity dissolved in PBS) or by i.pl. administration of OVA (3 μ g/paw) to evaluate the hypernociception.

2.7. Isolation and in vitro stimulation of neutrophils

Peripheral blood neutrophils were isolated from mice. After the lysis of red blood cells with ammonium chloride, neutrophils were isolated by density-gradient centrifugation using Percoll (Sigma). Neutrophils were washed with PBS and resuspended in RPMI 1640 medium supplemented 0.01% of BSA. Neutrophils were incubated with LSL (20 and 60 μ g/mL) or with medium alone (negative control) for 1 h at 37 °C. After that, neutrophils were centrifuged and washed twice with fresh medium for chemotaxis assay.

2.8. Chemotaxis assays

Cell migration was assessed by a 48-well microchemotaxis chamber technique as described previously [34]. A 28.6 μ L aliquot of chemotaxis stimuli (MIP-2, 10^{-7} M) was placed in the lower compartment and 50 μ L of cell suspension (1.0×10^6 /ml neutrophils) previously treated (as described above) was placed in the upper compartment of the chamber. The two compartments were separated by a polycarbonate filter (5- μ m PVP-free polycarbonate filter). The chamber was incubated at 37 °C for 1 h. At the end of the incubation period, the filter was removed fixed and stained. The number of migrated cells in five distinct fields was counted by light microscopy after coding the samples. All experiments were repeated at least two times with different cells. The migration was expressed as number of neutrophil per field.

2.9. Evaluation of systemic effects of LSL

Several parameters such as corporal mass loss, organ weight alteration, stomach ulceration, leukogram and blood chemistry parameters: concentration of urea, creatinine, alanine amino transferase (AST) and aspartate amino transferase (ALT) were evaluated after sub-chronic treatment with LSL. Animals were weighed and injected i.v. daily, with a single dose of LSL (10 mg/kg) or saline for 7 consecutive days. At the end of treatment, blood of the animals was collected from retro-orbital plexus under light anesthesia. Biochemical analyses were performed in serum samples obtained after centrifugation of total blood without anticoagulants, at 2500 rpm for 15 min. Standardized diagnostic kits by LABTEST® spectrophotometer were used in spectrophotometrical determination of the AST, ALT, creatinine and urea parameters. For leukogram determination, an aliquot of blood per animal was placed in EDTA and total and differential counts of leukocytes were carried out by standard manual procedures using light microscopy [35]. After sacrifice, liver, kidney and heart were removed and weighed. The wet weight of each organ was expressed relative to 10 g of body weight and compared to the saline-injected group (control). Possible ulcerative lesions or hemorrhage were quantified and macroscopically measured. The stomach was opened *via* longitudinal incision following the great curvature and exposed for evaluation of the number and grade of gastric mucosal lesions [36].

2.10. Effect of the pretreatment of animals with LSL lectin upon mechanical hypernociception induced by OVA in immunized mice and by carrageenan, prostaglandin E₂ (PGE₂) or formalin in naïve mice

Separate sets of 25 g mice (in Balb/c background) were tested for behavioral responses to mechanical stimuli using calibrated von Frey nylon filaments (tip diameter, 0.8 mm). The mice were placed in an elevated plastic cage on a wire mesh floor. Von Frey hairs were applied from below to the plantar surface of the right hind paw in ascending order of stimulus force (maxim 50 g). At threshold, the mouse withdraws its paw away from the hair. Right hindpaw were tested 3 times, and the interval between two consecutive trials on the same paw was at least 1 min. The results are presented as the average of responses against a given stimulus force.

All mice groups tested were pretreated 15 min before with lectin solution i.v. at 3 or 10 mg/kg in a final volume of 100 μ L. To test mechanical hypernociception in immunized mice, after lectin solution administration, the animals received an i.pl. injection of OVA (3 μ g/paw; 0.25 mL) at day 21 (see immunization procedures) and hypernociception was measured 3 h after OVA administration. Vehicle was injected i.pl. and also a false immunized animals group were challenged with OVA and used as a negative control. In a separate set of animals, hypernociception was measured at 0 and 3 h after injection of carrageenan (100 μ g paw; 0.25 mL) into the hind paws (i.pl.) or PGE₂ injection (100 ng paw; 0.25 mL) in mice pretreated

15 min before with intravenous (i.v.) administration of vehicle (saline) or LSL (3 or 10 mg/kg). Vehicle was injected i.pl. and used as a negative control. The carrageenan and PGE₂ doses injected were the smallest doses that evoked maximum acute mechanical hypernociception [15,37–40].

Formalin-induced hypernociception behavior was assessed as described previously [41]. Mice were allowed to acclimate for 15 min in a plastic box and injected subcutaneously with 25 μ l of 1% formaldehyde in 0.9% saline into the plantar right hindpaw of mice pretreated 15 min before with LSL or vehicle. The mice were observed for 60 min after the formalin injection, and the paw flinches counted during the observation period time. The acute phase (phase 1) was defined as 0–10 min after injection, and the persistent (tonic) phase (phase 2) was defined as 10–40 (phase 2a) min and 40–60 (phase 2b) after injection.

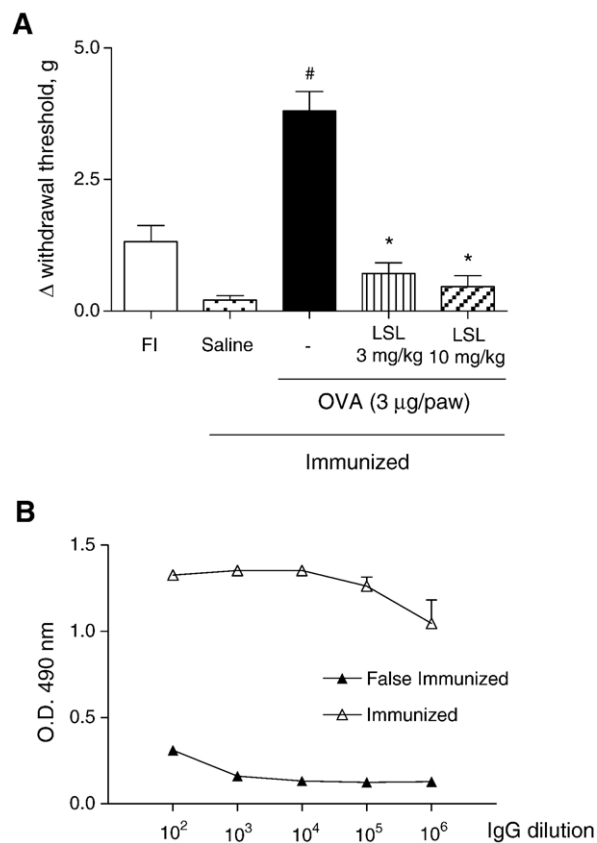


Fig. 2. (A) Anti-hypernociceptive effect of LSL in immunised mice. The mechanical hypernociception was evaluated after 3 h of i.pl. injection of OVA in immunised mice at 3 μ g/paw, in 25 μ l and in false-immunised mice (FI). Control immunised mice were injected with saline (25 μ l/paw). Results are expressed as mean \pm SD. ^{*} P < 0.05 when compared to OVA-injected group; [#] P < 0.05 compared to FI group (ANOVA followed by Bonferroni's t -test). (B) Anti OVA-specific IgG endpoint titer kinetics in sera following immunization of mice (Δ) or false immunized mice (\blacktriangle).

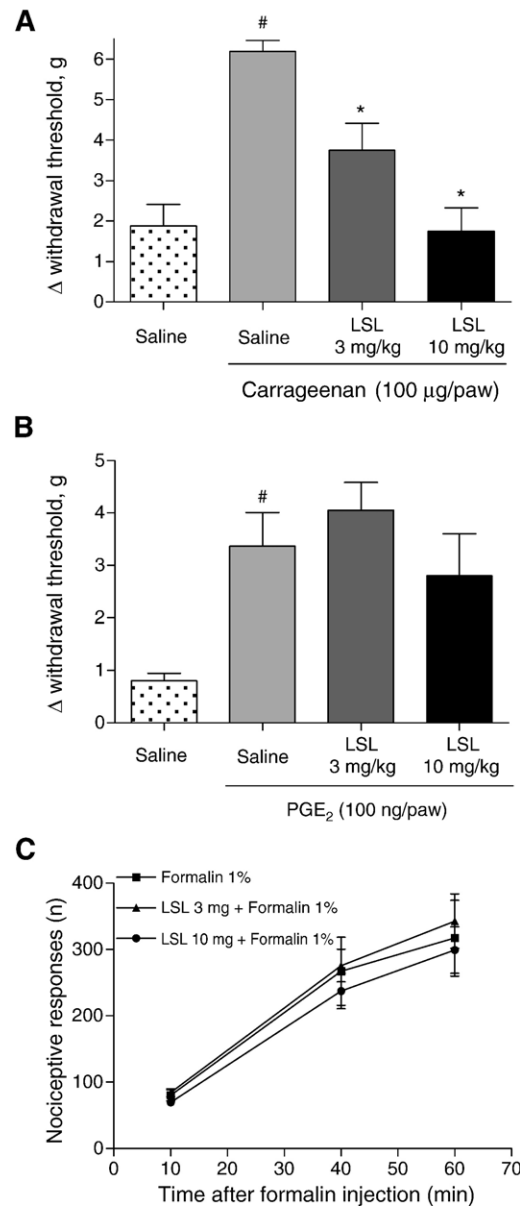


Fig. 3. Effects of the pretreatment with LSL lectin on mechanical hypernociception induced by carrageenan (A), PGE₂ (B) or formalin (C). Hypernociception was measured before and 3 h after injection of vehicle (saline), carrageenan (100 μ g) or PGE₂ into the hind paws of mice. Vehicle or LSL (3 or 10 mg/kg) was injected i.v. 15 min before carrageenan or PGE₂ injection. Results are expressed as means \pm SD. of the intensity of hypernociception (Δ reaction force, g). ^{*} P < 0.05 compared to Carrageenan group; [#] P < 0.05 compared to saline group (ANOVA followed by Bonferroni's t -test). To perform formalin test, LSL was injected i.v. 15 min before formalin administration. The mice were observed for 60 min after the formalin injection, and the paw flinches were counted during the observation time period. Results are expressed as means \pm SD. at 10, 40 and 60 min after injection.

2.11. Cytokine and chemokine assay

Mice received lectin solution i.v. at 3 and 10 mg/kg in a final volume of 100 μ l, and after 2 h of carrageenan stimuli, peritoneal exudates were recovered to cytokine measurements. In a separate set of animals, lectin solution was administered as described and inflammatory stimuli injection was done in the i.pl. right paw. After 1 h, animals were killed, the skin tissues were removed from the injected and control paws (saline). The samples were homogenized in 500 μ l of the appropriate buffer containing protease inhibitors. Levels of TNF- α , IL-1 β , MIP-1 (CCL3) and KC (CXCL1) were determined by ELISA using protocols supplied by the manufacturers (R and D Systems, Minneapolis) from both experiments. The results are expressed as picograms.

2.12. ELISA for IgG anti-OVA

A 96-well plate for ELISA (Costar 3590, USA) was coated with 10 μ g/mL of OVA in PBS overnight at 4 °C. After

nonspecific binding was blocked with 1% BSA (Sigma-Aldrich) in PBS for 2 h at room temperature, the diluted serum was added and incubated overnight at 4 °C. After washing with 0.05% Tween 20 in PBS, biotinylated anti-mouse IgG antibody (Sigma) was added and incubated for 1 h at room temperature. The wells were washed and avidin-HRP (DAKO A/S, Denmark; 1:5000) was added and after 30 min, the plates were washed, and the color reagent *o*-phenylenediamine (200 μ g/well, Sigma-Aldrich) was added. After 15 min, the reaction was interrupted with 1 M H₂SO₄. The color developed was determined by the absorbance at 490 nm.

2.13. Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SD (standard deviation). Statistical comparisons between groups were made using analyses of variance followed by Bonferroni's test. Significance was accepted when the *P* value was ≤ 0.05 .

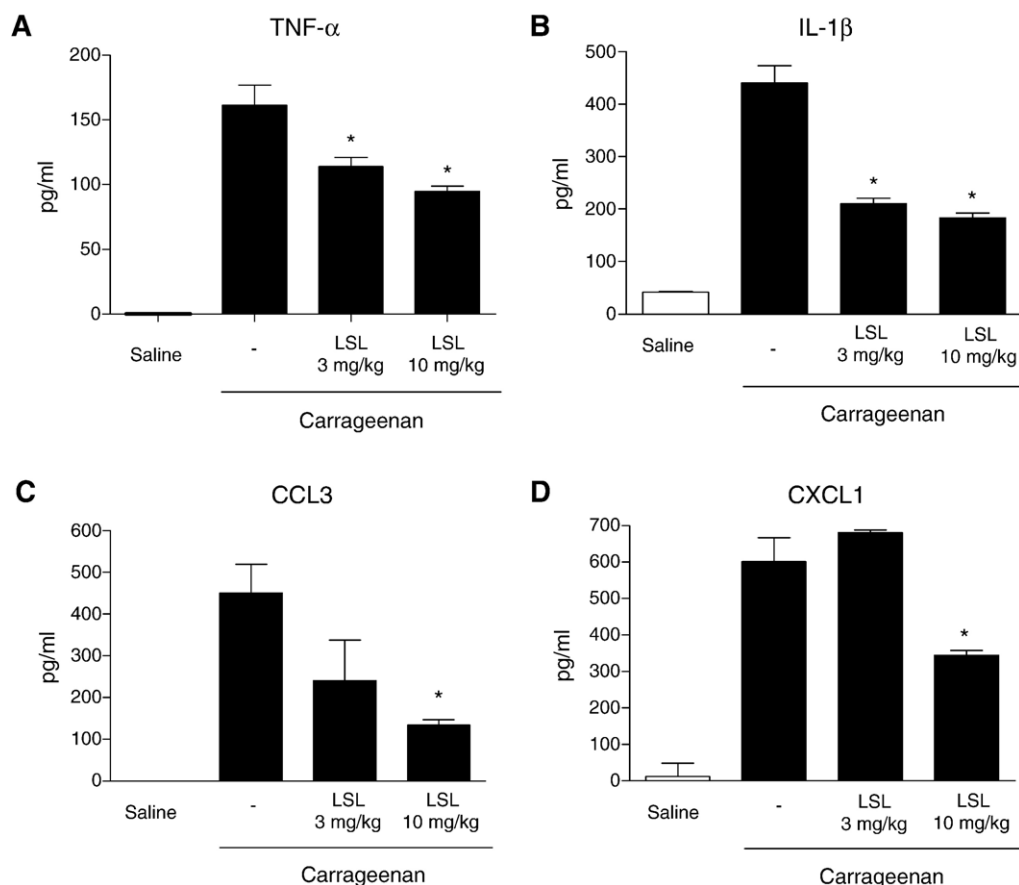


Fig. 4. Effect of LSL pretreatment on cytokines (TNF- α and IL-1 β) and chemokines (CCL3 and CXCL1) production on peritoneal exudates. Animals were injected with saline (control) or LSL (3 or 10 mg/kg) and 15 min later it was performed injection with carrageenan. The concentration of all tested cytokines and chemokines were determined by ELISA. Results are reported as means \pm SD, of five animals each group and are representative of two different experiments. **P* < 0.05 compared to Carrageenan group.

3. Results

3.1. Effect of LSL lectin on the neutrophil migration and leukocyte-endothelium interaction (rolling and adhesion) induced by carrageenan

The pretreatment with LSL (3 or 10 mg/kg; i.v.) decreased in a dose-dependent manner ($P<0.005$) the neutrophil migration in naïve mice, induced by intraperitoneal injection of carrageenan (500 $\mu\text{g}/0.2\text{ mL}$) determined 4 h later (Fig. 1A). Moreover, LSL (3 or 10 mg/kg) 15 min before the i.p. injection of carrageenan (100 $\mu\text{g}/\text{paw}$) reduced significantly the neutrophil accumulation assessed by measuring the paw tissue myeloperoxidase content after 3 h of stimuli ($P<0.05$, Fig. 1B).

To confirm the mechanisms by which the lectin decreases the neutrophil migration to the inflammatory site, we administered LSL lectin and evaluate the leukocyte-endothelium interaction *in vivo*. Leukocyte-endothelium interaction (rolling and adhesion) was examined in mesenteric postcapil-

lary venules using intravital microscopy system. The intraperitoneal injection of carrageenan (500 $\mu\text{g}/0.2\text{ mL}$) caused a significant increase in rolling (Fig. 1C) and adhesion (Fig. 1D) of leukocytes on endothelium compared with the i.p. injection of saline ($P<0.05$). The pre-treatment of the carrageenan-injected mice with LSL, at a dose of 10 mg/kg, significantly decreased leukocyte rolling and adhesion as shown Fig. 1 panel C and D respectively ($P<0.05$).

Moreover, it was also evaluated the neutrophil migration to the peritoneal cavity in immunized animals. After the i.p. injection of OVA in immunized mice, it was observed a significant increase on neutrophil migration, compared with false-immunized or PBS-injected immunized mice. The pretreated of the animals with LSL decreased the neutrophil migration in a dose-dependent manner (Fig. 1E).

We next investigated the ability of neutrophils to migrate *in vitro* in the presence of LSL. Fig. 1F shows that MIP-2 (10^{-7}M), a classic neutrophils chemoattractant chemokine, induces a significant neutrophil migration, compared with the control (RPMI 1640). When neutrophils were pre-incubated

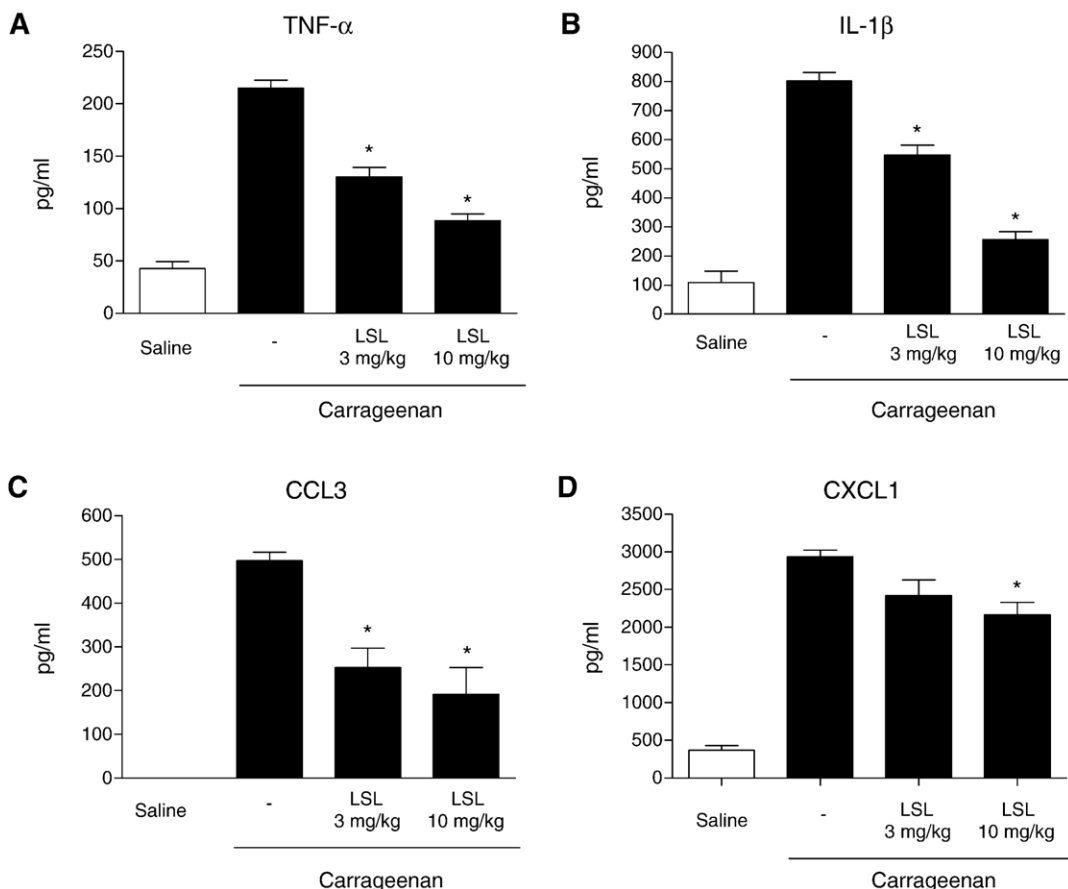


Fig. 5. Effect of LSL pretreatment on cytokines (TNF- α and IL-1 β) and chemokines (CCL3 and CXCL1) production on paw tissue. Animals were injected with saline (control) or LSL (3 or 10 mg/kg) and 15 min later it was performed i.p. injection with carrageenan. The concentration of all tested cytokines and chemokines were determined by ELISA. Results are reported as means \pm SD. of five animals each group and are representative of two different experiments. * $P<0.05$ compared to Carrageenan group.

with LSL, we observed similar migration to that induced by 10^{-7} M MIP-2. Even in the presence of the highest *in vitro* concentration of LSL tested (60 $\mu\text{g/mL}$), it was not verified any cell toxicity (98% of viable cells by trypan blue exclusion, data not shown).

3.2. Effect of LSL pretreatment on mechanical hypernociception

Immunized mice displayed significantly higher levels of hypernociception in response to i.pl. injection of OVA, at dose of 3 $\mu\text{g/paw}$, compared to PBS-injected immunized mice or false immunized control mice ($^{\#}P<0.05$). Prior treatment with LSL lectin (3 or 10 mg/kg, i.v., 15 min before) reduced OVA-induced hypernociception in immunized mice by 82 and 89% respectively ($^*P<0.05$) (Fig. 2A). It was performed an ELISA to measure the anti-OVA IgG titer, confirming the efficacy of the immunization and the absence of it on false immunized mice (Fig. 2B).

Compared with vehicle, the injection of carrageenan (100 $\mu\text{g/paw}$), PGE₂ (100 ng/paw) or formalin 1% (0.25 mL/paw) into the hind paw of naïve mice evoked a significant hypernociceptive effect ($P<0.05$), measured 3 h after injections. The pretreatment 15 min before with LSL (i.v.) inhibited in a dose-dependent manner (3 or 10 mg/kg), the carrageenan-evoked hypernociception (Fig. 3A), but was not able to inhibit the hypernociception caused by PGE₂ (Fig. 3B) or formalin (Fig. 3C).

3.3. Cytokine levels in the peritoneal exudates and paw tissue of the animals pre treated with LSL after inflammatory stimuli

The intraperitoneal injection of carrageenan (500 $\mu\text{g/cavity}$) induced a significant increase in the exudates levels of TNF- α (Fig. 4A), IL-1 β (Fig. 4B) and of the chemokines CCL3 (Fig. 4C) and CXCL1 (Fig. 4D) determined 2 h after.

Table 1
Sub-chronic treatment of animals with *Lonchocarpus sericeus* (LSL)

Parameters	Treatment (0.1 mL; i.v.)	
	Saline	LSL (10 mg/kg)
Corporal mass (g) after	33.3 \pm 0.4	30.7 \pm 0.1
Corporal mass (g) before	34.8 \pm 0.6	29.6 \pm 0.8
Liver (g/10 g body weight)	0.45 \pm 0.0	0.50 \pm 0.0
Kidney (g/10 g body weight)	0.06 \pm 0.0	0.07 \pm 0.0
Heart (g/10 g body weight)	0.05 \pm 0.0	0.05 \pm 0.0
Total leukocytes $\times 10^3/\text{mL}$	6119 \pm 503.9	9144 \pm 1117.0
Neutrophils $\times 10^3/\text{mL}$	1265 \pm 153.3	1138 \pm 153.4
Urea (mg/dL)	48.0 \pm 1.3	46.0 \pm 2.2
ALT (UI/L)	33.2 \pm 2.3	32.8 \pm 3.4
AST (UI/L)	52.7 \pm 3.4	62.1 \pm 4.8

Animals were injected daily in single doses during seven consecutive days. After seven days of treatment, animals were weighed, blood sample collected for leukogram count and biochemical dosage, sacrificed and the organs wet weight taken. Values are reported as mean \pm SD.

The pretreatment of the mice with LSL (3 or 10 mg/kg) 15 min early the challenge with carrageenan significantly inhibit the release of TNF- α , IL-1 β , CCL3 and CXCL1 ($P<0.05$).

It was also investigated the effect of LSL (3 or 10 mg/kg) on cytokine and chemokines production in the inflamed paw skin tissue after i.pl. administration of Cg (100 $\mu\text{g/paw}$). These cytokines and chemokines mediate the mechanical hypernociception induced by i.pl. administration of Cg. The LSL-treated mice decrease the paw skin tissue production of TNF- α (Fig. 5A), IL-1 β (Fig. 5B), CCL3 (Fig. 5C) and CXCL1 (Fig. 5D; $P<0.05$).

3.4. In vivo toxicity

LSL (10 mg/kg; i.v.) injected in a single dose scheme over seven consecutive days did not affect the animal corporal mass or the wet weight of animal organs such as liver, kidney and heart, compared to animals injected with sterile saline. All the organs evaluated showed normal appearance and absence of oedema over the whole course of lectin treatment. Additionally, the stomach macroscopic evaluation showed an intact mucosa with no visible lesions in the two groups analyzed (LSL or saline treated). Values obtained for urea and creatinine, used as parameters of renal function, did not differ from controls. Moreover, hepatic function, evaluated *via* hepatic enzymes (alanine amine transferase and aspartate amine transferase), and the number of blood circulating leukocytes were not altered by the lectin treatment in comparison to controls (Table 1).

4. Discussion

Growing insights in the role of glycoconjugates in bio-recognition, as ligands for lectins, increase the interest to study the effects of plant lectins. Lectins are a structurally diverse class of proteins, their only common features being the ability to bind carbohydrates specifically and reversibly and to agglutinate cells [42]. Attention is given regarding their application as tools in biotechnology or in immunotherapies [43].

In the present study, we demonstrated that the pretreatment of mice with *Lonchocarpus sericeus* lectin (LSL) attenuated the leukocyte-endothelium interaction (rolling and adhesion), neutrophil transmigration and also the inflammatory hypernociception in response to injection of inflammatory stimuli. However, LSL was unable to inhibit MIP-2-induced neutrophil chemotaxis *in vitro*. The inhibition of cytokines/chemokines production by treatment of the animals with LSL correlates with the decrease of neutrophil influx to inflammatory site and of mechanical hypernociception.

Trafficking of leukocytes to injured tissues is a sequential and coordinated process that requires cytokines/chemokines, selectins, integrins and intercell

adhesion molecules (ICAMs). It has been described that TNF- α and IL-1 β are released in an early phase of the inflammatory process triggered by non-immune or by immune stimuli [4]. Although these cytokines are not chemotactic for leukocytes by themselves [44], when injected in different animals models they induce neutrophil migration [45,46]. Moreover, the neutralization of these cytokines or their receptors reduces the leukocyte migration induced by different inflammatory stimuli [47,48]. It could be explained by the fact that TNF- α and IL-1 β are able to act on leukocytes and resident cells inducing the expression of integrins and stimulating the production of platelet-activating factor (PAF), LTB₄ and chemokines, which are able to induce the neutrophil recruitment [49]. Moreover, TNF- α and IL-1 β also act on endothelial cells stimulating the expression of selectin and the up-regulation of ICAMs [3].

Besides cytokines, chemokines, mainly the CXC branch, display a central role in mediating the signaling cascade that recruits neutrophils to sites of inflammation. The chemokines bind to receptors on the surface of these cells induces their chemotaxis and also induce the release of other chemotactic mediators, such as LTB₄ [50–52]. In fact, it has been demonstrated that the blockade of this G protein-coupled receptor or of its ligands, chemokines are associated with inhibition of neutrophil migration in models of infection and acute or chronic inflammatory diseases in mice [51,53,54]. We observed that the pretreatment of the animals with LSL inhibits the cytokines (IL-1 β and TNF- α) and chemokines (CXCL1 and CCL3) release stimulated by carrageenan. These findings explain the decreased neutrophil migration and the leukocyte rolling and adhesion induced by carrageenan. The fact that LSL does not have significant effect on neutrophil chemotaxis *in vitro*, reinforcing this conclusion. However, we could not discard that the reduction in the rolling and adhesion are also consequence of the interference of LSL on the interaction of leukocytes to endothelium. In fact, several lectin reduce these interaction of leukocytes *in vitro* and *in vivo* experiments [55,56]. So, the development of therapies using LSL as prototypes to inhibit neutrophil migration could be an important aim to management inflammatory diseases.

Besides its inhibitory effect upon neutrophil migration, LSL also present an additional analgesic action observed after inflammatory stimuli induced by carrageenan and in OVA-induced immune inflammation in mice. The importance of this effect resides in the fact that pain is a classical sign of inflammation, and certainly, one of the main reasons that leads the patients look for treatments. It was observed that LSL inhibits carrageenan and OVA-

mediated inflammatory hypernociception but not affect hypernociceptive effect of prostaglandins and sympathetic amines, which are mediators that act directing in the nociceptive neurons inducing hypernociception [6,39,57]. It is well-defined that a sequential cascade of cytokines/chemokines precedes the release of the mediators that act directing in the nociceptive receptors inducing their sensitization [6,15,16,39,57,58]. The noxious stimuli induce the release of TNF- α , which in turn stimulates interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 β (IL-1 β) and chemokines formation (CINC-1 in rats or KC in mice). Subsequently, IL-1 β stimulates prostaglandin production [6,39], whereas chemokines induces the release of sympathomimetic amines from sympathetic nerve fibers [6,57]. The fact that the pretreatment with LSL fails to inhibit PGE₂-induced hypernociception corroborates with the idea of a preventive effect of this drug upon cytokine/chemokine production. Reinforcing, this conclusion, LSL pre-treated did not reduce the nociceptive response induced by i.pl. injected formalin in mice. Different from that of carrageenan, diluted formaldehyde causes a biphasic characteristic response, initiated by direct stimulation of nociceptors, leading to activation of C fibers [59]. This phase is followed by an inflammatory phase, in which the mainly mediators are histamine, bradykinin and sympathomimetic amines [60–64].

However, we cannot discard that the inhibition of neutrophil migration by LSL also account for its analgesic action of this lectin. In fact, there are evidences that the inhibition of neutrophil migration into joint of patients precedes clinical signs of inflammation, including pain [2]. Moreover, experimental studies demonstrated that inhibition of the neutrophil migration reduces the hypernociception induced by different inflammatory stimuli [6,17,65,66]. There is evidence that LSL also reduces the inflammatory oedema formation [23]. We did not investigated if the inhibitory effects of LSL upon neutrophil migration and hypernociception are consequence of the inhibition of the oedema. However, there are evidences that these events could happen independently. In fact, the cytokines TNF- α , IL-1 β or IL-8 at doses which induced hypernociception and neutrophil migration did not induce oedema formation. Moreover, thalidomide and pentoxifylline, drugs that inhibit cytokine production, at doses that reduce neutrophil migration and hypernociception do not affect the oedema formation [58,67,68].

In conclusion, we demonstrated that the antinociceptive and anti-neutrophil migration effects of *L. sericeus* lectin are associated with the inhibition of the production of cytokines and chemokines and consequently neutrophil migration. In this context, it is important to strengthen the

therapeutic potential of drugs that target leukocyte migration to inflammatory focus as well as the inflammatory pain to control either acute or chronic inflammatory diseases. Thus, the results point out requirements for investigations on the possible use of *L. sericeus* lectin as a prototype for development of new drugs to treatment of inflammatory diseases.

Acknowledgments

The authors would like to thank Mrs. Ieda R. Schivo and Giuliana Bertozi for their technical assistance.

References

- [1] Malech HL, Gallin JI. Current concepts: immunology. Neutrophils in human diseases. *N Engl J Med* 1987;317:687–94.
- [2] Jones AK, Al-Janabi MA, Solanki K, Sobnack R, Greenwood A, Doyle DV, et al. *In vivo* leukocyte migration in arthritis. *Arthritis Rheum* 1991;34:270–5.
- [3] Wagner JG, Roth RA. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev* 2000;52:349–74.
- [4] Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000;118:503–8.
- [5] Tager AM, Luster AD. BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003;69:123–34.
- [6] Cunha TM, Verri Jr WA, Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:1755–60.
- [7] Guo RF, Ward PA. Role of C5a in inflammatory responses. *Annu Rev Immunol* 2005;23:821–52.
- [8] Panes J, Perry M, Granger DN. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol* 1999;126:537–50.
- [9] Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 1999;57:1–164.
- [10] Parada CA, Vivancos GG, Tambeli CH, de Queiroz Cunha F, Ferreira SH. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:2923–8.
- [11] Bonica JJ. Clinical importance of hyperalgesia. In: Willis Jr WD, editor. *Hyperalgesia and allodynia*, vol. 1. New York: Raven Press; 1992. p. 17–43.
- [12] Ferreira SH, Nakamura M. Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca²⁺ dependent process. *Prostaglandins* 1979;18:179–90.
- [13] Nakamura M, Ferreira SH. A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. *Eur J Pharmacol* 1987;135:145–53.
- [14] Khasar SG, McCarter G, Levine JD. Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and *in vitro* sensitization of rat nociceptors. *J Neurophysiol* 1999;81:1104–12.
- [15] Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Ferreira SH. The pivotal role of tumor necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 1992;107:660–4.
- [16] Lorenzetti BB, Veiga FH, Canetti CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) mediates the sympathetic component of inflammatory mechanical hypersensitivity in rats. *Eur Cytokine Netw* 2002;134:456–61.
- [17] Levine JD, Lau W, Kwiat G, Goetzl EJ. Leukotriene B₄ produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leukocytes. *Science* 1984;225:743–5.
- [18] da Cunha JM, Rae GA, Ferreira SH, de Cunha F de Q. Endothelins induce ETB receptor-mediated mechanical hypernociception in rat hindpaw: roles of cAMP and protein kinase C. *Eur J Pharmacol* 2004;501:87–94.
- [19] Nakamura-Craig M, Gill BK. Effect of neurokinin A, substance P and calcitonin gene related peptide in peripheral hyperalgesia in the rat paw. *Neurosci Lett* 1991;124:49–51.
- [20] Ferreira SH, Romitelli M, de Nucci G. Endothelin-1 participation in overt and inflammatory pain. *J Cardiovasc Pharmacol* 1989;13:S220–2.
- [21] Van Damme EJM, Peumans WJ, Barre A, Rouge P. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionarily related proteins with diverse biological roles. *Crit Rev Plant Sci* 1988;17:575–692.
- [22] Hébert E. Endogenous lectins as cell surface transducers. *Biosci Rep* 2000;20:213–37.
- [23] Alencar NM, Teixeira EH, Assreuy AMS, Cavada BS, Flores CA, Ribeiro RA. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. *Mediators Inflamm* 1999;8:107–13.
- [24] Assreuy AMS, Shibuya RA, Martins GJ, Souza MLP, Cavada BS, Moreira RA, et al. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. *Mediators Inflamm* 1997;6:201–10.
- [25] Assreuy AMS, Martins GJ, Moreira MEF, Brito GAC, Cavada BS, Ribeiro RA, et al. Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. *J Urol* 1999;161:1988–93.
- [26] Alencar NM, Cavalcante CF, Vasconcelos MP, Leite KB, Aragao KS, Assreuy AM, et al. Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. *J Pharm Pharmacol* 2005;57:919–22.
- [27] Cavada BS, Santos CF, Grangeiro TB, Nunes EP, Sales PV, Ramos RL, et al. Purification and characterization of a lectin from seeds of *Vatairea macrocarpa* Duke. *Phytochemistry* 1998;49:675–80.
- [28] Guerrero AT, Verri Jr WA, Cunha TM, Silva TA, Rocha FA, Ferreira SH, et al. Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological screening. *Pharmacol Biochem Behav* 2006;84:244–51.
- [29] Baez S. Simultaneous measurements of radii and wall thickness of microvessels in the anesthetized rat. *Circ Res* 1969;25:315–29.
- [30] Fortes ZB, Farsky SP, Oliveira MA, Garcia-Leme J. Direct vital microscopic study of defective leukocyte-endothelial interactions in diabetes mellitus. *Diabetes* 1991;40:1267–73.
- [31] Granger DN, Benoit JN, Suzuki M, Grisham MB. Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1989;257:G683–8.
- [32] Freund J. The mode of action of immuno-pharmacological adjuvants. *Adv Tuberc Res* 1956;1:130–48.
- [33] Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol* 2001;70:849–60.
- [34] Arraes SM, Freitas MS, da Silva SV, de Paula Neto HA, Alves-Filho JC, Martins MA, et al. Impaired neutrophil chemotaxis in

- sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation. *Blood* 2006;108:2906–13.
- [35] Souza GEP, Ferreira SH. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. *Agents Actions* 1985;17:97–103.
- [36] Santucci L, Fiorucci S, Giansanti M, Brunori PM, Di Matteo FM, Morelli A. Pentoxifylline prevents indomethacin induced acute gastric mucosal damage in rats: role of tumour necrosis factor alpha. *Gut* 1994;35:909–15.
- [37] Ferreira SH, Nakamura M, de Abreu Castro MS. The hyperalgesic effects of prostacyclin and prostaglandin E2. *Prostaglandins* 1978;16:31–7.
- [38] Ferreira SH, Zanin T, Lorenzetti BB, de Souza MZ, Medeiros MC, Leme JG. Increased vascular permeability, oedema and hyperalgesia caused by carrageenan in the rat's paw. *Agents Actions* 1978;8:159.
- [39] Ferreira SH, Lorenzetti BB, Bristow AF, Poole S. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature* 1988;334:698–700.
- [40] Ferreira SH, Lorenzetti BB, Poole S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 1993;110:1227–31.
- [41] Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992;51:5–17.
- [42] Sharon N. Lectin-carbohydrate complexes of plants and animals: an atomic view. *Trends Biochem Sci* 1993;18:221–6.
- [43] Rudiger H, Gabius HJ. Plant lectins: occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconj J* 2001;18:589–613.
- [44] Burke-Gaffney A, Hellewell PG. Tumour necrosis factor-alpha-induced ICAM-1 expression in human vascular endothelial and lung epithelial cells: modulation by tyrosine kinase inhibitors. *Br J Pharmacol* 1996;119:1149–58.
- [45] Casale TB, Carolan EJ. Cytokine-induced sequential migration of neutrophils through endothelium and epithelium. *Inflamm Res* 1999;48:22–7.
- [46] Bombini G, Canetti C, Rocha FA, Cunha FQ. Tumour necrosis factor-alpha mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. *Eur J Pharmacol* 2004;496:197–204.
- [47] Smeets RL, Joosten LA, Arntz OJ, Bennink MB, Takahashi N, Carlsen H, et al. Soluble interleukin-1 receptor accessory protein ameliorates collagen-induced arthritis by a different mode of action from that of interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 2005;52:2202–11.
- [48] Feldmann M, Pusey CD. Is there a role for TNF-alpha in anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis? Lessons from other chronic inflammatory diseases. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:1243–52.
- [49] Gaudreault E, Stankova J, Rola-Pleszczynski M. Involvement of leukotriene B4 receptor 1 signaling in platelet-activating factor-mediated neutrophil degranulation and chemotaxis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2005;75:25–34.
- [50] Khandaker MH, Mitchell G, Xu L, Andrews JD, Singh R, Leung H, et al. Metalloproteinases are involved in lipopolysaccharide- and tumor necrosis factor-alpha-mediated regulation of CXCR1 and CXCR2 chemokine receptor expression. *Blood* 1999;93:2173–85.
- [51] Ramos CD, Canetti C, Souto JT, Silva JS, Hogaboam CM, Ferreira SH, et al. MIP-1alpha[CCL3] acting on the CCR1 receptor mediates neutrophil migration in immune inflammation via sequential release of TNF-alpha and LTB4. *J Leukoc Biol* 2005;78:167–77.
- [52] Ramos CD, Fernandes KS, Canetti C, Teixeira MM, Silva JS, Cunha FQ. Neutrophil recruitment in immunized mice depends on MIP-2 inducing the sequential release of MIP-1alpha, TNF-alpha and LTB4. *Eur J Immunol* 2006;36:2025–34.
- [53] Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Londhe V, Xue YY, Li K, et al. Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury. *J Clin Invest* 2002;110:1703–16.
- [54] Moreno SE, Alves-Filho JC, Rios-Santos F, Silva JS, Ferreira SH, Cunha FQ, et al. Signaling via platelet-activating factor receptors accounts for the impairment of neutrophil migration in polymicrobial sepsis. *J Immunol* 2006;177:1264–71.
- [55] Coelho MB, Desouza IA, Freire MG, Marangoni S, Antunes E, Macedo ML. Neutrophil migration in mice induced by a mannose-binding lectin isolated from *Annona coriacea* seeds. *Toxicon* 2006;48:529–35.
- [56] Pereira-da-Silva G, Moreno AN, Marques F, Oliver C, Célia-Jamur M, Panunto-Castelo A, et al. Neutrophil activation induced by the lectin KM+ involves binding to CXCR2. *Biochim Biophys Acta* 2006;1760:86–94.
- [57] Cunha FQ, Lorenzetti BB, Poole S, Ferreira SH. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. *Br J Pharmacol* 1991;104:765–7.
- [58] Poole S, Lorenzetti BB, Cunha JM, Cunha FQ, Ferreira SH. Bradykinin B1 and B2 receptors, tumour necrosis factor alpha and inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 1999;126:649–56.
- [59] Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 1989;38:347–52.
- [60] Hong Y, Abbott FV. Contribution of peripheral alpha 1A-adrenoceptors to pain induced by formalin or by alpha-methyl-5-hydroxytryptamine plus noradrenaline. *Eur J Pharmacol* 1996;301:41–8.
- [61] Jourdan D, Ardid D, Bardin L, Bardin M, Neuzeret D, Lanphouthacoul L, et al. New automated method of pain scoring in the formalin test in rats. *Pain* 1997;71:265–70.
- [62] Hama A, Menzaghi F. Antagonist of nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) enhances formalin-induced nociception in rats: tonic role of nAChRs in the control of pain following injury. *Brain Res* 2001;888:102–6.
- [63] Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev* 2001;53:597–652.
- [64] Parada CA, Tambeli CH, Cunha FQ, Ferreira SH. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. *Neuroscience* 2001;102:937–44.
- [65] Verri Jr WA, Schivo IR, Cunha TM, Liew FY, Ferreira SH, Cunha FQ. Interleukin-18 induces mechanical hypernociception in rats via endothelin acting on ETB receptors in a morphine-sensitive manner. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;310:710–7.
- [66] Santodomingo-Garzon T, Cunha TM, Verri Jr WA, Valério DA, Parada CA, Poole S, et al. Atorvastatin inhibits inflammatory hypernociception. *Br J Pharmacol* 2006;149:14–22.
- [67] Vale ML, Cunha FQ, Brito GA, Benevides VM, Ferreira SH, Poole S, et al. Anti-nociceptive effect of thalidomide on zymosan-induced experimental articular incapacitation. *Eur J Pharmacol* 2006;536:309–17.
- [68] Vale ML, Benevides VM, Sachs D, Brito GA, da Rocha FA, Poole S, et al. Antihyperalgesic effect of pentoxifylline on experimental inflammatory pain. *Br J Pharmacol* 2004;143:833–44.