



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

EDFRANCK DE SOUSA OLIVEIRA VANDERLEI

ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA DA LECTINA DA ALGA  
MARINHA VERDE *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh var. *lycopodium* EM ANIMAIS

FORTALEZA-CE

2008

EDFRANCK DE SOUSA OLIVEIRA VANDERLEI

ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA DA LECTINA DA ALGA  
MARINHA VERDE *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh var. *lycopodium* EM ANIMAIS

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À  
COORDENAÇÃO DO CURSO DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA,  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
A OBTENÇÃO DO GRAU DE  
MESTRE EM BIOQUÍMICA.

ORIENTADORA: PROF. NORMA  
MARIA BARROS BENEVIDES

FORTALEZA

2008

EDFRANCK DE SOUSA OLIVEIRA VANDERLEI

ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA DA LECTINA DA ALGA  
MARINHA VERDE *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh var. *lycopodium* EM ANIMAIS

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM BIOQUÍMICA, COMO REQUISITO PARCIAL PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE  
MESTRE EM BIOQUÍMICA

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

PROF. Dra. NORMA MARIA BARROS BENEVIDES (ORIENTADORA)

---

PROF. Dra. VILMA DE LIMA (CO- ORIENTADORA)

---

PROF. Dra. MÁRJORY LIMA HOLANDA

Dedico este trabalho à  
minha família e à Deus.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por estar presente sempre na minha vida e por ser meu refúgio em todos os momentos, seja de alegria, ou de dificuldades.

Aos meus pais, Severino Gomes Vanderlei Júnior e Maria Amélia de Sousa Oliveira Vanderlei, que são base de tudo na minha vida, pelo amor e carinho e principalmente, por me ensinarem sempre a ser uma pessoa com bom caráter e capaz de superar as dificuldades que a vida impõe.

Aos meus queridos irmãos, Hyder de Sousa Oliveira Vanderlei, Helen de Sousa Oliveira Vanderlei e Hermínia Adélia de Sousa Oliveira Vanderlei, pelo amor e carinho e por estarem sempre comigo em todos os momentos.

Ao meu tio Francisco Sousa Oliveira, por me incentivar a enfrentar o desafio de seguir o caminho da docência.

À Prof. Dra. Norma Maria Barros Benevides, que foi mais que uma orientadora, foi uma verdadeira guia e grande responsável pela realização deste trabalho.

À Prof. Dra. Vilma de Lima, pela excelente co-orientação durante os ensaios biológicos.

A Prof. Dra. Márjory Lima Holanda, pela amizade, e por gentilmente integrar a banca examinadora deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Algas Marinhas: José Ariévilo, Luana Maria, Edna Pereira, Ana Luiza, Bruno Pedrosa, Natássia Ribeiro, Danilo Ricarte, Ismael Nilo, Ticiane Abreu (I), Ticiane Lima (II), Érika Bessa, Gabriela Almeida (Gabi), Ygor Raphael e Ianna Wivianne, pela amizade e por terem me ajudado na minha adaptação ao ambiente de laboratório.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia Oral: Neiberg Lima, Kharla Rabelo, Paula Goes e Ana Patrícia Lima e Iracema Melo, que contribuíram bastante na realização dos ensaios biológicos.

Aos funcionários da Secretaria (Márcio Souza) e Biotério (Corneville Neto) e aos demais amigos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, que gentilmente contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), através do convênio com o curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará e auxílios de projetos e bolsas concedidas a esse Departamento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através do convênio com o curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará e pela bolsa concedida ao autor.

À Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa (FUNCAP), através do financiamento de projetos ligados ao curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

À Universidade Federal do Ceará, através do Centro de Ciências – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina, que viabilizaram a execução deste trabalho em seus laboratórios e que contribuíram para enriquecer o conhecimento do autor.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Aspecto macroscópico da Alga marinha <i>Caulerpa cupressoides</i> (A) e sua classificação taxonômica (B) .....	34
Figura 2. Esquema de extração e purificação da alga marinha verde <i>C. cupressoides</i> .....	38
Figura 3. Aspecto de um camundongo apresentando contorção abdominal seguida por extensão das patas posteriores induzida por ácido acético 0,8 % no ensaio de Contorções Abdominais .....	40
Figura 4. Aspecto de um camundongo lambendo a pata traseira após aplicação de formalina 1% .....	41
Figura 5. Placa Quente .....	42
Figura 6. Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE- Celulose do extrato total da alga <i>C. cupressoides</i> equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 .....	47
Figura 7. Cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-100 do PII da DEAE-celulose, equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 .....	48
Figura 8. Eletroforese PAGE-SDS em presença de 2-mercaptoetanol da lectina da alga <i>C. cupressoides</i> .....	49
Figura 9. Efeito da administração sistêmica da lectina <i>C.cupressoides</i> na resposta às contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos .....	54
Figura 10. Efeito da administração sistêmica da lectina <i>C.cupressoides</i> na resposta às contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos frente a controles positivos e negativos .....	55

Figura 11. Efeito da administração sistêmica da lectina <i>C.cupressoides</i> no teste da formalina em camundongos .....	59
Figura 12. Efeito da administração sistêmica da lectina <i>C.cupressoides</i> no teste da formalina em camundongos frente a controles positivos e negativos .....	60
Figura 13. Efeito da administração sistêmica da lectina <i>C.cupressoides</i> , morfina ou indometacina durante o tempo de reação ao estímulo térmico (Placa Quente) induzido em camundongos .....	63
Figura 14. Efeito da lectina <i>C. cupressoides</i> no modelo de peritonite induzida por carragenina no número total de leucócitos (A) ou no número de neutrófilos (B) .....	66
Figura 15. Variação da relação de peso dos animais durante o período de sete dias como parâmetro de toxicidade da LCc .....	69
Figura 16. Variação do peso dos órgãos (coração, rim e fígado) em camundongos ao longo de sete dias como parâmetro de toxicidade da LCc .....	70
Figura 17. Dosagem bioquímica de Uréia em camundongos representando a sua quantidade por U/L .....	72
Figura 18. Dosagem bioquímica da TGO e da TGP em camundongos representando a sua quantidade por U/L .....	73

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Purificação da lectina da alga marinha vermelha <i>C.cupressoides</i> por Cromatografias de troca iônica e de afinidade .....	51
Tabela 1.2. Purificação da lectina da alga marinha vermelha <i>C.cupressoides</i> por Cromatografias de afinidade e de filtração em gel .....	51
Tabela 2. Efeito antinociceptivo da lectina Cc na ausência e presença de seu açúcar inibidor (mucina), no teste de contorções abdominais em camundongos .....	53
Tabela 3. Efeito antinociceptivo da lectina Cc na ausência e presença de seu açúcar inibidor (mucina), no teste da formalina em camundongos .....	58
Tabela 4. Efeito da LCc no teste da placa quente em camundongos .....	62
Tabela 5. Correlação órgão/massa corpórea entre o grupo controle e a LCc .....	68
Tabela 6. Dosagens enzimáticas da Uréia e das Transaminases Glutâmico Oxaloacética (TGO) e Glutâmico Pirúvica (TGP) .....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DEAE	Dietilaminoetil
kDa	Quilodáltons
A280	Absorbância a 280 nm
nm	Nanômetro
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida
TB	Tampão Tris-HCl 25mM, pH 7,5
PI	Pico I
PII	Pico II
LCc	Lectina <i>Caulerpa cupressoides</i>
IASP	Associação Internacional de Estudos sobre Dor

## RESUMO

**Atividades antinociceptiva e antiinflamatória da lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh var. *lycopodium* em animais.** Edfranck S. O. Vanderlei. Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará. Data da defesa: 19 de novembro de 2008. Prof<sup>a</sup> Orientadora: Dr<sup>a</sup> Norma M. Barros Benevides.

A busca de novos compostos alternativos no controle da dor e da inflamação, com mínimos efeitos colaterais, tem despertado o interesse pelas algas marinhas. O objetivo desse trabalho foi investigar o potencial antinociceptivo e antiinflamatório da lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh var. *lycopodium* (LCc) em animais. A LCc, apresentando atividade hemaglutinante contra eritrócitos tripsinizados de coelho, foi obtida a partir da aplicação do extrato protéico total em procedimentos cromatográficos de troca-iônica em coluna de DEAE-celulose e de afinidade em coluna de Sephadex G-100. A seguir, foi utilizada nos ensaios de nocicepção e inflamação, usando camundongos *Swiss* e ratos *Wistar*, respectivamente. A LCc foi administrada 30 min antes de cada estímulo nocigênico, ou seja, antes da injeção i.p. de ácido acético a 0,8% (10 µl/ml), da injeção intraplantar da formalina a 1% (20 µl/pata) ou do teste da Placa Quente (51±1 °C), e seu efeito comparado a dos animais não tratados (Salina) ou pré-tratados s.c. com Indometacina ou Morfina, ambas a 5 mg/kg. Observou-se que a LCc (3, 9 e 27 mg/kg; i.v.) reduziu significativamente o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em 37,2%; 53,5% e 86,0%, respectivamente. LCc (27 mg/kg) também reduziu ( $p<0,05$ ) a fase 1 (neurogênica) e a fase 2 (inflamatória) induzidas pela formalina, em 45,3% e 86,3%, respectivamente. A LCc (27 mg/kg), entretanto, não foi capaz de reduzir a nocicepção avaliada no teste da Placa Quente, quando comparada à morfina. Para confirmar a atividade da LCc, verificou-se que os efeitos antinociceptivos foram abolidos quando a LCc foi pré-incubada com a glicoproteína mucina (2 mg/ml), inibidora de sua atividade hemaglutinante. Sugere-se, portanto, que a atividade antinociceptiva observada foi, de fato, devido à LCc e que essa atividade ocorra predominante via inibição de mecanismos periféricos. Em seguida, realizou-se o ensaio da migração de leucócitos na cavidade peritoneal induzida por Carragenina (Cg-tipo  $\lambda$ ; 700 µg/cavidade), onde se observou que a administração da LCc (9 mg/kg; i.v.) 30 min antes da Cg, reduziu significativamente a contagem do número de neutrófilos em 65,9%. Finalmente, a LCc (9 mg/kg), foi administrada em camundongos machos *Swiss* diariamente por 7 dias e no 8º dia amostras sanguíneas foram coletadas para dosagens séricas de uréia e transaminases (TGO e TGP), e remoção de órgãos para avaliação da relação peso órgão/peso corporal. Observou-se que a LCc não causou alterações hepáticas ou renais, visto que não determinou alterações, de forma significativa, nas atividades das transaminases TGO (Salina=29,44±3,193; LCc=36,00±21,98 U/l) e TGP (Salina=13,59±3,373; LCc=17,64±2,676 U/l), nem dos níveis de uréia (Salina=224,3±10,84; LCc=270,0±24,00 U/l), além de não determinar variação significativa do peso úmido dos respectivos órgãos: fígado (Salina=5,23±0,195; LCc=6,02±0,100), rim (Salina=0,840±0,015; LCc=0,851±0,065) e coração (Salina=0,568±0,055; LCc=0,639± 0,039). Em resumo, conclui-se que a LCc possui propriedades antinociceptiva e antiinflamatória periférica, podendo ser uma ferramenta importante e candidata a novos estudos complementares.

**Palavras-chave:** Alga marinha, lectina, *Caulerpa cupressoides*, antinocicepção, migração.

## ABSTRACT

**Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the lectin from the green marine alga *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh var *lycopodium* (CcL) in animals.** Edfranck S. O. Vanderlei. Dissertation of Master presented to the Graduate Program in Biochemistry. Department of Biochemistry and Molecular Biology. Federal University of Ceará. Defense date: November 19<sup>th</sup> 2008. Prof<sup>a</sup> Orientator: Dr<sup>a</sup> Norma M. Barros Benevides.

The search of new alternative compounds in the control of the pain and inflammation, with minima collateral effects, it has been aroused from marine algae. The aim of this work was to investigate the potential antinociceptive and anti-inflammatory of the lectin from the green marine alga *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh var *lycopodium* (CcL) in animals. The CcL, presenting haemagglutinating activity against trypsin-treated erythrocytes from rabbit, was purified by application of crude extract on ion exchange chromatography on DEAE-cellulose followed by affinity chromatography on Sephadex G-100 column. To proceed, it was used in the nociception and inflammation assays, using male *Swiss* mice and male *Wistar* rats, respectively. CcL was administered 30 min before each nocigenic challenge, that is, before the injection i.p of acetic acid 0.8% (10 µl/ml), of the intraplantar injection of 1% formalin (20 µL/paw) or of the Hot Plate test (51±1 °C), and compared to non treated animals or to pre-treated by Indomethacin or Morphine, both at 5 mg/kg; s.c. It was observed that the LCc (3, 9 or 27 mg/kg) reduced significantly the number of writhes induced by acetic acid 37.2%; 53.5% e 86.0%, respectively. CcL (27 mg/kg) also reduced (p<0.05) the 1<sup>st</sup> phase (neurogenic) and the 2<sup>nd</sup> phase (inflammatory) observed after administration of the formalin (45.3% and 86.3%, respectively). However, the CcL (27 mg/kg) was not capable to reduce the nociception evaluated by Hot Plate test, compared to morphine. The antinociceptive effects were abolished when the CcL was pre-incubated with mucin (2 mg/ml), inhibitory glycoprotein of its haemagglutinating activity. Therefore, it is suggested that the antinociceptive activity of the CcL can be predominant by inhibition of peripheric mechanisms. After this, was realized the assays of neutrophil migration for peritoneal cavity by Carrageenan (Cg-type λ; 700 µg/cavity or paw), where was observed that the administration of the CcL (9 mg/kg) 30 min before Cg reduced the neutrophil counts significantly by 65.9%. Finally, the CcL (9 mg/kg) was administered daily in male mice for 7 days and in the 8<sup>th</sup>, blood samples were collected for and transaminases (TGO and TGP) dosages, and organs remotion to evaluate the of the organ weight /body weight relation. It was observed that CcL not caused hepatic or renal alterations, because it was not determined significant changes in the activities of TGO (Saline=29,44±3,193; CcL=36,00±21,98 U/l) and TGP (Saline=13,59±3,373; CcL=17,64±2,676 U/l) and urea levels (Saline=224,3±10,84; CcL=270,0±24,00 U/l). In addition, it was not determined significant variation on the wet weight of the organs: liver (Saline=5,23±0,195; CcL=6,02±0,100), kidney (Saline=0,840±0,015; CcL=0,851±0,065) and heart (Saline=0,568±0,055; CcL=0,639± 0,039). In summary, we conclude that the CcL has peripheral antinociceptive and anti-inflammatory properties and may be an important tool and candidate for new complementary studies.

Key words: marine alga, lectin, *Caulerpa cupressoides*, antinociception, migration.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>x</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1. Algas Marinhas .....</b>	<b>15</b>
<b>1.2. Lectinas .....</b>	<b>16</b>
1.2.1. Lectinas de Algas Marinhas .....	17
<b>1.3. Isolamento e Purificação de Lectinas de Algas Marinhas .....</b>	<b>18</b>
<b>1.4. Características físico-químicas de Lectinas de Algas Marinhas .....</b>	<b>19</b>
<b>1.5. Atividades Biológicas de Lectinas de Algas Marinhas .....</b>	<b>20</b>
<b>1.6. Nocicepção e Inflamação .....</b>	<b>22</b>
1.5.1. Dor e Nocicepção .....	22
1.5.2. Inflamação .....	24
A) Células envolvidas na Inflamação .....	25
B) Mediadores Químicos da Inflamação .....	28
1.5.3. Fármacos utilizados na Dor e na Inflamação .....	29
<b>2- OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
<b>2.1. Geral .....</b>	<b>33</b>
<b>2.2. Específicos .....</b>	<b>33</b>
<b>3. MATERIAIS .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1. Algas Marinhas .....</b>	<b>34</b>
<b>3.2. Células Sanguíneas .....</b>	<b>34</b>
<b>3.3. Animais .....</b>	<b>34</b>
<b>3.4. Soluções, Drogas e Corantes .....</b>	<b>35</b>

<b>4. MÉTODOS .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1. Isolamento da Lectina da Alga Marinha <i>C.cupressoides</i>.....</b>	<b>36</b>
4.1.1 - Preparação do Extrato Bruto .....	36
4.1.2. Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE-Celulose .....	36
4.1.3. Cromatografia de Afinidade em Coluna de Sephadex G-100 .....	36
<b>4.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em presença de SDS e de <math>\beta</math>-Mercaptoetanol .....</b>	<b>37</b>
<b>4.3. Determinação de Proteínas .....</b>	<b>37</b>
<b>4.4. Determinação da Atividade Hemaglutinante .....</b>	<b>39</b>
<b>4.5. Atividades Antinociceptiva e Antiinflamatória .....</b>	<b>39</b>
4.5.1. Testes de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético.....	39
4.5.2. Teste da Formalina .....	40
4.5.3. Teste da Placa Quente .....	41
4.5.4. Ensaio de Migração de Leucócitos induzido por Carragenina .....	42
4.5.5. Avaliação Parcial de Toxicidade Aguda por Dose Repetida .....	43
<b>4.6. Análise Estatística .....</b>	<b>45</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
5.1. Extração e Purificação da LCc .....	46
5.2. Ensaio Biológicos da LCc .....	52
5.3. Avaliação Toxicológica .....	67
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>74</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>75</b>

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Algas Marinhas

As algas representam um grupo diversificado de organismos fotossintetizantes, as quais podem ser encontradas nos mais diversos ambientes aquáticos e terrestres úmidos, podendo assumir estilos de vida na forma de seres planctônicos (células únicas e microscópicas) e bentônicos (tecidos especializados). Elas utilizam diversas estratégias de perpetuação de espécies e de síntese de inúmeras classes de compostos bioativos, os quais estão normalmente envolvidos nos processos metabólicos (primário e secundário), responsáveis pelas mais diversas funções biológicas comuns a todo ser vivo ou particular de grupos taxonômicos específicos (SZE, 1997).

As algas são talófitas (plantas sem raízes, caules e folhas) apresentando a clorofila “a” como pigmento fotossintético principal (LEE, 1997). A distribuição das algas está relacionada com a temperatura e salinidade da água, disponibilidade de luz solar, correntes dos oceanos e das condições físicas e químicas afins (RAVEN, EVERT, EICHHOM, 1996).

As algas marinhas vêm sendo denominadas, segundo a botânica, de acordo com sua estrutura física, função e ciclo reprodutivo em: Chlorophyta (algas verdes); Phaeophyta (algas pardas) e Rhodophyta (algas vermelhas) (RAVEN, EVERT, EICHHOM, 1996). Tal classificação teve como base a grande variação dentre as suas características, tais como pigmentos envolvidos na captação de luz para a fotossíntese (conhecidos como pigmentos acessórios), polissacarídeos de reserva, organização celular, filogenia molecular, ciclo de vida, morfologia e ecologia (SZE, 1997; RAVEN, EVERT, EICHHOM, 2001).

A divisão Chlorophyta, em especial, representa o grupo mais diversificado dentre todas as algas (morfologia e ciclo de vida), compreendendo aproximadamente 17.000 espécies e sendo amplamente distribuída em diversos ambientes costeiros do mundo. A denominação de algas verdes se deve ao fato à maior intensidade da clorofila em relação aos outros pigmentos, apresentado talos com constituição menos complexa que as algas das divisões Rhodophyta e Phaeophyta. Essas características também as levaram a serem comparadas às plantas superiores, tendo-se como bases comparativas a constituição bioquímica (pigmentos, produtos de reserva e composição das paredes celulares) e características morfológicas das células. Apesar de a maioria ser aquática, elas também podem ser encontradas em outros ambientes (neve, tronco de árvores, solos etc), suportando sobreviver em condições adversas em ambientes sujeitos a variações extremas de salinidade (como baías, estuários e poças

situadas em costões rochosos), sendo particularmente relacionadas com ambientes eutróficos, tais como os gêneros *Ulva* e *Enteromorpha* (RAVEN, EVERT, EICHHOM, 2001).

Os exemplares da ordem Caulerpales, também citadas como Siphonales ou Codiales, são essencialmente marinhos e de águas tropicais apresentando organização filamentosa cenocítica, assumindo um formato de uma célula gigante devido à presença de numerosos filamentos de material de parede celular denominados de trabécula, e constituídos geralmente, de um talo rastejante de formato macroscópico fixado ao substrato através de uma porção rizomatosa que se expande ao longo do substrato, fixando-se através de estruturas denominadas rizóides, estes se apresentando na forma simples ou em tufos (JOLY, 1965; SZE, 1997). Ao longo de toda a sua porção rizomatosa são encontrados ramos eretos (também chamados de assimiladores) que, por sua vez, são ramificados dependendo da morfologia de cada espécie e cenocíticos em todas as porções (SZE, 1997).

*Caulerpa* é um gênero de algas verdes, da família Caulerpáceae, morfologicamente incomum por ser caracterizado como uma única célula contendo vários núcleos. A parede celular dos representantes deste gênero é destituída de celulose e apresenta polímeros de xilano e manana ligados através de ligações  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,4, respectivamente (LEE, 1997). As espécies *C. cupressoides*, *C. mexicana*, *C. prolífera*, *C. racemosa* e *C. sertularioides* são as mais comuns no litoral brasileiro (JOLY, 1965), formando extensos tapetes verdes na zona entre marés (SZE, 1997).

## 1.2. Lectinas

As lectinas são proteínas ubíquas, com ampla distribuição na natureza, já foram encontradas em bactérias, fungos, algas, vegetais superiores, vertebrados, invertebrados e vírus, que se caracterizam por ligar-se de forma reversível a carboidratos específicos. Os animais produzem uma variedade de lectinas, muitas delas classificadas em famílias, dependendo da similaridade da seqüência e da especificidade ao carboidrato (LIS & SHARON, 1998).

O termo “Lectinologia”, primeiramente referido por Potapov (1968) e ainda hoje bastante aceito, vem a enfatizar a existência das lectinas como precursoras de uma nova e promissora ferramenta biotecnológica de vasto potencial e aplicabilidade.

Consideradas como sendo uma classe especial de proteínas bioativas que possuem uma atividade ligante a carboidratos, as lectinas, também conhecidas como aglutininas ou hemaglutininas (VAN DAMME *et al.*, 1998), são atualmente tidas como possíveis ferramentas

de elucidação da informação biológica contida nos açúcares, tendo em vista seu importante papel no reconhecimento celular (NEVES, 1999).

As lectinas formam um grupo heterogêneo de proteínas que apresentam grande variedade em tamanho, estrutura e organização molecular, que possuem, em comum, a capacidade de reconhecer e interagir com sítios contendo glicoconjugados. Devido a essa capacidade de interação a carboidratos, as lectinas podem se ligar a certos componentes da membrana das células sanguíneas, ocasionando aglutinação, que constitui no principal atributo para sua detecção, purificação e caracterização (LIS, SHARON, 1998).

As lectinas, quanto a sua estrutura, estão divididas em 4 tipos:

**Merolectinas:** São lectinas que possuem um único domínio ligante a carboidrato, portanto não aglutinam hemácias.

**Hololectinas:** Possuem dois ou mais domínios ligantes a carboidrato; a maior parte das lectinas pertence a esse grupo, pois se comportam como hemaglutininas.

**Quimerolectinas:** Caracterizam-se por uma fusão de proteínas que possuem pelo menos um domínio ligante a carboidrato e outro domínio com atividade catalítica.

**Superlectinas:** São lectinas que possuem 2 ou mais domínios ligantes a carboidratos, sendo que esses domínios têm especificidade para açúcares diferentes.

### 1.2.1. Lectinas de Algas Marinhas

O primeiro relato de lectinas em algas marinhas foi descrito por W. Boyd, Almodovar e L. Boyd, em 1966, os quais, através de “screening” de detecção de lectinas em algas, demonstraram que essas lectinas são capazes de aglutinar eritrócitos em humanos. Desde então, lectinas vêm sendo frequentemente encontradas em algas marinhas, sendo as algas vermelhas (Rhodophyceae) as mais estudadas, seguidas pelas algas verdes (Chlorophyceae) e pardas (Phaeophyceae).

Algas marinhas de 27 espécies coletadas na costa nordestina foram testadas em ensaios de detecção de atividade hemaglutinante contra eritrócitos de animais e humanos tratados com tripsina, bromelaína, papaína e subtilisina. Os resultados apontaram para dados positivos de hemaglutinação em 12 espécies, entre algas verdes, vermelhas e pardas, sendo cada uma delas capaz de aglutinar pelo menos um dos tipos de eritrócitos enzimaticamente tratados e testados (AINOUZ *et al.*, 1992). Dentre os eritrócitos testados, aqueles obtidos de coelho foram mais sensíveis à hemaglutinação, acompanhados dos demais eritrócitos tratados enzimaticamente com papaína. Duas espécies de algas vermelhas (*Acanthophora spicifera* e *Enantiocladia*

*duperreyi*) e uma de alga verde (*Ulva fasciata*) exibiram atividade hemaglutinante frente a eritrócitos do grupo O de humano, enquanto que algas verdes das espécies *Codium isthmocladium* e *Caulerpa sertularioides* foram específicas para eritrócitos humanos do grupo B. Três espécies de algas dentre as demais testadas, entre elas a alga vermelha *Amansia multifida* e as algas pardas *Spatoglossum schroederi* e *Padina gymnospora*, apresentaram uma especificidade não usual para eritrócitos dos grupos A e O de humano (AINOUZ *et al.*, 1992).

Adicionalmente, lectinas em 30 espécies de algas marinhas do litoral do Nordeste brasileiro, utilizando eritrócitos nativos e enzimaticamente tratados de coelho, galinha, carneiro e humanos. A maioria dos extratos aglutinou pelo menos um dos eritrócitos testados. Eritrócitos de carneiro e de coelho foram os mais satisfatórios para a detecção da presença de lectinas (FREITAS *et al.*, 1997).

Ao analisar os dados publicados sobre a presença de lectinas em algas marinhas, Sampaio (1997) constatou que apenas 700 espécies haviam sido examinadas e que, em 57% delas observou-se a presença de lectinas. Levando-se em consideração que na natureza existem muitos milhares de espécies de algas, este número representa apenas uma pequena parcela da contribuição das algas marinhas para os estudos de detecção e isolamento de lectinas.

### **1.3. Isolamento e Purificação de Lectinas de Algas Marinhas**

A primeira lectina isolada foi a da espécie *Ptilota plumosa*, por Rogers, Blunden e Evans, em 1977. Os procedimentos de isolamento de lectinas de algas marinhas geralmente são iniciados a partir da extração de proteínas solúveis do material biológico, com o uso de soluções salinas tamponantes. Após a obtenção desses extratos protéicos, tais proteínas solúveis passam por uma série de etapas que podem se estender desde precipitações salinas das mesmas, até emprego de variadas matrizes cromatográficas, sejam elas de filtração em gel, troca iônica ou afinidade.

As cromatografias de troca iônica têm se mostrado de grande utilidade no processo de purificação de lectinas de algas, sendo utilizadas de forma isolada ou em combinação com outros procedimentos cromatográficos. Como por exemplo, a lectina da alga marinha vermelha *Ptilota serrata* foi purificada pela combinação de processos cromatográficos de troca iônica em gel de DEAE-Sephacel e exclusão molecular em Bio Gel P-100 (ROGERS, HORI, 1993).

Atualmente, há uma grande tendência no uso de cromatografias de afinidade para a purificação de lectinas de algas marinhas, tendo em vista a maior praticidade por estas dispensadas, principalmente no tocante a redução do número de etapas de purificação e ao fato

destas apresentarem uma maior confiança na pureza do material obtido. Sampaio *et al.* (1998) utilizaram a galactose presente na goma de guar no processo de isolamento da lectina da alga marinha vermelha *Ptilota filicina*. Oliveira *et al.* (2002) isolaram a lectina presente na alga marinha vermelha *Pterocladia capilacea* utilizando procedimento cromatográfico de afinidade em gel de goma de guar. Além dessas, Benevides *et al.* (1998a) usaram  $\alpha$ -lactose e Costa *et al.* (1999) utilizaram a manana de levedura em procedimentos cromatográficos de afinidade para o isolamento de lectinas presentes nas algas marinhas vermelhas *Enantiocladia duperreyi* e *Amansia multifida*, respectivamente.

Ainouz *et al.* (1995) purificaram as lectinas das algas marinhas vermelhas *Briothamnion seaforthii* e *B. triquetrum* pela aplicação da fração protéica de ambas em colunas cromatográficas de DEAE-celulose, enquanto que a lectina da alga marinha vermelha *Solieria filiformis* foi purificada por cromatografia de troca iônica em gel de DEAE-celulose, seguida de procedimento cromatográfico de afinidade em coluna de Manana-Sepharose CL-4B (BENEVIDES *et al.*, 1996).

A lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* foi primeiramente purificada por cromatografia de afinidade em gel de  $\alpha$ -lactose-agarose, seguida de filtração em gel em Bio Gel P-100 (BENEVIDES *et al.*, 2001).

Em resumo, várias lectinas de algas têm sido purificadas e caracterizadas. No entanto, seu número é considerado ainda bastante reduzido quando comparado a lectinas isoladas e caracterizadas de plantas superiores, o que favorece maior espaço para estudo de novas lectinas, inclusive por procedimentos diversos de purificação.

#### 1.4. Características físico-químicas de Lectinas de Algas Marinhas

Lectinas de algas diferem das de vegetais superiores em várias propriedades. Em geral, têm pequena massa molecular e não reconhecem açúcares simples, sendo mais específicas para oligossacarídeos complexos, em especial, glicoproteínas. Além disso, muitas das lectinas de algas marinhas não requerem cátions divalentes para exercerem suas atividades biológicas (ROGERS, HORI, 1993). Estas proteínas ocorrem principalmente na forma monomérica e têm uma alta proporção de aminoácidos ácidos, com ponto isoelétrico entre 4 e 6 (HORI, MIKAZAWA, ITO, 1990).

As lectinas das algas verdes *Codium adherens*, *C. effusum*, *C. capitatum* e *C. platylobium*, foram purificadas por Rogers *et al.* (1994) e os dados obtidos por eletroforese em

PAGE-SDS revelaram que todas as quatro lectinas apresentavam massas aparentes entre 11 e 13 kDa e não dependiam de cátions divalentes para exercerem suas atividades biológicas.

As lectinas das algas marinhas vermelhas *B.seaforthii* e *B.triquetrum*, isoladas por Ainouz *et al.* (1995), mostraram-se não dependentes de cátions divalentes e não foram inibidas por açúcares simples. Estas lectinas apresentaram uma simples banda com mobilidade semelhante por PAGE-SDS e massas moleculares estimadas por filtração em gel de 4,5 kDa e 3,5 kDa para *B. seaforthii* e *B. triquetrum*, respectivamente.

Benevides *et al.* (1996) isolaram uma lectina monomérica da alga *Solieria filiformis*, com 1,5% de sua composição em açúcar. Esta lectina foi inibida pelas glicoproteínas manana de levedura, avidina, “egg white” e ovalbumina e quando analisada por cromatografia de filtração em gel de Superose 12-R (FPLC) revelou uma massa de 21,9 kDa, enquanto por PAGE-SDS, apresentou uma massa molecular estimada em 29 kDa.

Costa *et al.* (1999) estudando a alga marinha vermelha *Amansia multifida*, observaram que a lectina presente nesta alga continha 2,9% em açúcar neutro e era inibida pelas glicoproteínas avidina, fetuína, “egg white” e levedura de manana. A massa molecular dessa proteína foi estimada em 26,9 kDa por filtração em gel e em 24,5 por PAGE-SDS. A focalização isoelétrica detectou a presença de cinco isolectinas com pI ácido variando entre 5,4 e 6,2. A análise de aminoácidos mostrou ser esta lectina rica em prolina, glicina e ácido aspártico e pobre em histidina e fenilalanina.

A lectina purificada da *C.cupressoides* foi inibida por outros derivados da galactose, por dissacarídeos ( $\alpha$ -lactose) e fortemente inibida por mucina de estômago de porco. Sua massa molecular, determinada por filtração em gel, foi de 44,7 kDa, enquanto por PAGE-SDS na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol apresentou massa molecular aparente de aproximadamente 23,2 kDa. Apresentou uma predominância de glicina, dos aminoácidos acídicos glutâmico e aspártico e do aminoácido hidroxilado serina em sua composição (BENEVIDES *et al.*, 2001).

### **1.5. Atividades Biológicas de Lectinas de Algas Marinhas**

Estudo envolvendo lectinas de algas marinhas têm tido um substancial progresso ao longo dos últimos 15 anos e padrões e características começam a aparecer. A maioria das lectinas de algas marinhas apresenta baixas massas moleculares quando comparadas às derivadas de plantas terrestres, e essa característica pode tornar tais proteínas moléculas mais apropriadas para o uso em ensaios biológicos. (ROGERS, HORI, 1993).

É sabido que as características de reconhecimento de estruturas de açúcares e glicoconjugados dessas proteínas fazem delas importantes ferramentas para o reconhecimento e isolamento desses tipos moleculares, sejam eles dissolvidos em soluções ou presentes em membranas biológicas.

A lectina isolada da alga vermelha *Solieria filiformis* reduziu significativamente a densidade de células de bactérias gram-negativas. A estimulação do crescimento de *B. cereus* não foi observada quando a lectina era previamente incubada com manana. Foram os primeiros dados sobre a inibição e estimulação de células de bactérias patogênicas por lectinas de algas marinhas (HOLANDA *et al.*, 2005).

A avaliação do potencial inseticida do extrato total e lectina da alga *Gracilaria ornata* mostrou que a emergência das larvas de *Callosobruchus maculatus* foi inibida pelas duas frações, sugerindo um potencial biotecnológico para utilização da lectina tóxica obtida a partir dessa alga (LEITE *et al.*, 2005).

A atividade antiviral foi mostrada por Ziólkowska & Wlodawer (2006), na qual uma lectina provinda da alga vermelha *Griffithsia sp.* apresenta múltiplos açúcares conjugados em seus sítios de ligação. Esses açúcares são responsáveis pela ligação a moléculas de carboidratos complexas presentes nos envelopes virais.

Estudos preliminares têm revelado que lectinas de algas marinhas da costa cearense apresentam atividade antinociceptiva em vários modelos experimentais de nocicepção (VIEIRA *et al.*, 1999; ANDRADE, 1999).

Extratos protéicos totais de 10 algas marinhas (*Cladophora vagabunda*, *Bryothamnion seaforthii*, *Bryothamnion triquetrum*, *Gracilaria caudata*, *Meristiella echinocarpa*, *Hypnea musciformis*, *Amansia multifida*, *Digenea simplex*, *Caulerpa cupressoides* e *Solieria filiformis*) apresentaram efeito nociceptivo periférico demonstrado pelo teste das contorções abdominais induzidos por ácido acético em camundongos. Os extratos concentrados mais ativos, aplicados na concentração de 10 mg de proteína/kg por via intraperitoneal, foram os das algas vermelhas *Gracilaria caudata* e *Meristiella echinocarpa* (ANDRADE, 1999).

Por outro lado, as frações analisadas por Andrade (1999), nenhuma foi eficaz na redução do edema de pata induzido pela formalina em camundongos, mas um efeito antiedematogênico significativo foi observado no modelo inflamatório de edema de pata induzido por carragenina em camundongos.

Viana *et al.* (2002) realizaram testes analgésicos com as frações obtidas por precipitação por sulfato de amônio 0/60 e a lectina purificada das algas *Bryothamnion triquetrum* (BT) e *Bryothamnion seaforthii* (BS) mostrando que elas possuíam efeito

nociceptivo periférico (teste da formalina e o teste de contorções abdominais) e central (teste da placa quente). Todos os efeitos foram revertidos por naloxona, um antagonista da morfina, sugerindo a participação do sistema opióide na atividade antinociceptiva observada. A fração F (0/60) da alga *B. seaforthii* sofreu tratamento térmico, enzimático e químico, ocasionando uma perda em torno de 98% da atividade hemaglutinante, permanecendo a atividade analgésica no teste das contorções abdominais inalterada, como também, apresentou uma ação inibitória, significativa, sobre a agregação plaquetária induzida pelos agonistas ADP e adrenalina.

A lectina de *Amansia multifida* apresentou atividade antinociceptiva, com ação periférica, central e anti edematogênica. A avaliação do envolvimento da glicoproteína avidina não foi capaz de inibir o efeito antinociceptivo, enquanto a D-manose inibiu esse efeito (NEVES, 2005).

Mais recentemente, alguns estudos usando lectinas de algas marinhas também demonstraram atividade analgésica e antiinflamatória (NEVES *et al.*, 2007; BITENCOURT *et al.*, 2008).

Estudos recentes em pesquisa têm mostrado que as algas são organismos promissores em compostos bioativos. Dentre as diferentes classes de compostos com notáveis atividades biológicas, as lectinas de algas surgem como uma classe importante de produtos naturais (CARDOZO *et al.*, 2007)

## **1.6. Nociceção e Inflamação**

### **1.6.1. Dor e Nociceção**

A dor é definida, segundo a Associação Internacional de Estudos sobre Dor (IASP, 2004), como uma sensação desagradável de intensidade variável, que varia de leve a intensa. Esse processo se caracteriza por uma reação orgânica e emocional. É importante lembrar que a dor é sempre subjetiva, pois é produzida por alguns receptores especializados presentes em nosso corpo, traduzidos em uma resposta emocional a esse estímulo.

Nociceção, contudo, compreende o mecanismo pelo qual estímulos periféricos nocivos são transmitidos ao sistema nervoso central. É uma resposta direta a um evento indesejável associado à lesão tecidual e difere de dor simplesmente por não apresentar o componente afetivo. O termo nociceção é utilizado com melhor precisão em testes com animais, uma vez que é muito difícil elaborar testes que meçam o componente afetivo (RANG *et al.*, 2007).

A lesão tecidual é a causa imediata da dor e resulta em liberação local de uma variedade de substâncias químicas que atuam sobre as terminações nervosas, seja ativando-as diretamente ou potencializando sua sensibilidade a outras formas de estimulação.

Os nervos periféricos têm terminações sensoriais nos tecidos periféricos do corpo e são ativados por estímulos de vários tipos (mecânicos, térmicos e químicos). A dor pode ser induzida num receptor de três formas específicas:

1) Mecânica - Ocorre um estímulo mecânico capaz de excitar um mecanorreceptor de dor (receptor estimulado por meios físicos, tais como, impacto, fricção, tracionamento, rompimento). Ex: Corte, pancada, perfuração, abrasão, pressão.

2) Térmica - Ocorre um estímulo térmico que é capaz de excitar um termorreceptor de dor (receptor sensível ao calor ou ao frio). Ex: Queimaduras até segundo grau. Obs: no caso das queimaduras pode ocorrer quimiocepção por extravasamento de fluidos celulares que mediam a dor.

3) Química - Ocorre estímulo mediado por mecanismo químico em um quimioceptor (receptor sensível a alterações químicas do meio ou a ligação de um mediador químico ou neurotransmissor). Ex: Na inflamação (seja ela aguda ou crônica) ocorre destruição de algumas células ou mesmo liberação (sem morte) de algumas substâncias que são capazes de estimular algumas terminações nervosas (Ex: prostaglandinas) ou hipersensibilizá-las a outro estímulo.

Um excesso de estímulos mecânicos ou térmicos obviamente pode causar dor aguda, mas a persistência de tal dor depois de removido o estímulo ou a dor decorrente de alterações inflamatórias ou isquêmicas nos tecidos, em geral refletem alteração do ambiente químico dos aferentes de dor (RANG *et al.*, 2007).

Os nociceptores polimodais correspondem ao principal tipo de neurônio sensitivo periférico que responde a estímulos nocivos. A maioria é composta de fibras C não mielinizadas cujas terminações respondem a estímulos térmicos, mecânicos e químicos. Vários metabólitos e substâncias são liberados de células lesadas ou isquêmicas ou de tecidos inflamados, incluindo ATP, prótons (produzidos por ácido láctico), 5-hidroxitriptamina (5-HT), histamina e  $K^+$ , muitos dos quais afetam as reações nociceptivas. O pH baixo excita os neurônios aferentes nociceptivos em parte por abertura de canais de cátions ativados por prótons e em parte por facilitação do receptor vanilóide TRPV1 (RANG *et al.*, 2007).

### 1.6.2. Inflamação

A inflamação é uma reação do organismo frente a uma infecção ou lesão dos tecidos, através da liberação de mediadores químicos. A dor inflamatória, portanto, corresponde à liberação de mediadores químicos por células não neuronais no local de injúria.

O processo inflamatório ocorre em dois momentos, sendo o primeiro desencadeado logo após a infecção (inflamação aguda), de curta duração, podendo variar de algumas horas até poucos dias entre o início, o desenvolvimento e o término. Essa fase é caracterizada por apresentar infiltrado predominantemente neutrofílico no sítio da inflamação, extravasamento de material protéico e plasma, aumento da permeabilidade vascular e eventos sistêmicos tais como aumento da temperatura, dor e elevação do conteúdo plasmático de várias proteínas (BAUHMANN, GAUDIE, 1994).

O segundo momento depende ou não da resolução do processo na fase aguda (inflamação crônica), caracterizado pela presença de macrófagos e linfócitos, além de angiogênese e proliferação de tecido conjuntivo. A inflamação crônica é considerada um processo prolongado que pode ter semanas ou até anos de duração (BAUHMANN, GAUDIE, 1994).

A inflamação age no sentido de remover ou inibir o agente causador, desencadeando uma série de eventos que promovem o retorno do organismo à condição normal, incluindo a reconstrução do tecido lesado (ROBBINS, COTRAN, KUMAR, 1994). Ao ocorrer uma lesão tecidual ocasionada por bactérias, traumatismo, substâncias químicas, calor ou qualquer outro fenômeno, os tecidos lesados liberam múltiplas substâncias que provocam alterações nos tecidos. Esta por sua vez, pode resultar em danos teciduais e até mesmo decomposição fisiológica, disfunção e morte dos órgãos, estando dividida em duas categorias principais: aguda e crônica, diferindo na duração e no aspecto patológico (GUYTON, HALL, 2002).

A inflamação pode ser caracterizada por: vasodilatação dos vasos sangüíneos locais, aumento da permeabilidade dos capilares locais, coagulação dos líquidos nos espaços intersticiais, migração de inúmeros granulócitos e monócitos para o tecido e edema das células. 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 (NATHAN, 2002).

Assim, dos inúmeros produtos teciduais que causam essas reações incluem histamina, bradicinina, serotonina, prostaglandinas, produtos de reação do sistema da coagulação sangüínea e múltiplas substâncias denominadas linfocinas, que são liberadas pelos linfócitos T sensibilizados (WAGNER, ROTH, 2000).

Essas respostas de defesa são iniciadas e reguladas por uma variedade de diferentes mediadores liberados por diferentes tipos de células e a compreensão dos efeitos, dos mecanismos de ação e dos usos clínicos dos fármacos que afetam as respostas inflamatórias e imunológicas depende de uma avaliação do modo pelo qual estas células e seus mediadores interagem (RANG *et al*, 2007).

#### A) Células envolvidas na Inflamação

Dentre as células envolvidas na inflamação, algumas estão presentes nos tecidos como as células endoteliais vasculares, mastócitos e macrófagos, enquanto plaquetas e leucócitos têm acesso à área de inflamação a partir do sangue.

Os leucócitos são corpúsculos incolores implicados nas defesas celulares e imunocelulares do organismo (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004). São células ativamente móveis que podem ser divididas em duas classes: células polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e mononucleares (monócitos e linfócitos) (BEVILACQUA *et al.*, 1994).

Quando os tecidos são invadidos por microorganismos, os leucócitos são atraídos por quimiotaxia, isto é, substâncias originadas dos tecidos, do plasma sangüíneo e dos microorganismos provocam nos leucócitos uma resposta migratória, dirigindo-se estas células para os locais onde existe maior concentração dos agentes quimiotáticos (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004).

Os neutrófilos têm núcleos formados por 2 a 5 lóbulos (mais freqüentemente 3 lóbulos) (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004) e constituem na primeira linha de defesa celular contra a invasão de microorganismos, já que são os primeiros leucócitos a alcançarem a área de inflamação, sendo fagócitos ativos de partículas de pequenas dimensões. (RANG *et al.*, 2007).

São os leucócitos predominantes na circulação, mas possuem vida curta, sendo produzidos na medula óssea e considerados os principais elementos celulares em muitas formas de inflamação aguda principalmente durante o estágio inicial da resposta inflamatória e suas funções são: manutenção da defesa normal do hospedeiro contra microorganismos invasores, remover restos teciduais e agir nos meios extra e intracelular para matar e degradar

microorganismos através de enzimas digestivas presentes nos seus grânulos citoplasmáticos (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004).

Possuem atividade microbicida e fagocitária nos locais de inflamação, pois funcionam como descarregadores do conteúdo dos grânulos citoplasmáticos nos vacúolos fagocitários, além de reconhecer, aderir e englobar partículas (fagocitose) (HAMPTON, KETTLE, WINTERBOURN, 1998).

Durante a fagocitose há um aumento brusco e acentuado no consumo de oxigênio, havendo produção de peróxido de hidrogênio e ânion superóxido pelos neutrófilos, que provavelmente são responsáveis pela morte de bactérias fagocitadas (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004).

No processo inflamatório, ocorre primeiramente rolagem dos neutrófilos ao longo do endotélio ativado, eles então aderem e finalmente migram para fora do vaso sanguíneo em direção ao espaço extravascular (RANG *et al.*, 2007).

Os eosinófilos em geral são bem menos numerosos que os neutrófilos, apresentam núcleo geralmente bilobulado. Sua principal característica é a presença de granulações ovóides que se coram pela eosina (granulações acidófilas). Encontrados nos tecidos doentes, os eosinófilos predominam em duas formas de inflamação: alergia e infecções parasitárias. Presume-se que suas principais funções sejam de fagocitar e destruir determinados complexos de antígenos com anticorpos e limitar e circunscrever o processo inflamatório (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004).

Os basófilos por sua vez, têm um núcleo volumoso, com forma retorcida e irregular, geralmente com aspecto da letra “S”. Estão localizados imediatamente na parte externa de muitos dos capilares do organismo e diferentemente dos demais granulócitos, não são encontrados no tecido conjuntivo e são as menores células granulocíticas, possuindo um núcleo volumoso, bilobado ou multilobado, cromatina nuclear periféricamente condensada em grânulos citoplasmáticos menores do que os outros granulócitos. Constituem menos de 1% dos leucócitos do sangue, sendo difíceis de ser encontrados nos esfregaços de sangue, apresentando a função de secretar mediadores inflamatórios que aumentam a permeabilidade vascular e fatores quimiotáticos que recrutam outras células inflamatórias (RANG *et al.*, 2007).

Os linfócitos têm núcleo esférico e citoplasma escasso, que aparece como anel delgado em volta do núcleo. São divididos de acordo com suas propriedades e nos receptores localizados em suas membranas em 2 tipos: Linfócito B e Linfócito T. Quando entra em contato com antígenos, os linfócitos B se dividem e se diferenciam em células plasmáticas, que sintetizam e secretam anticorpos para o sangue, linfa e fluido intercelular. Os linfócitos T são

os responsáveis pelas respostas imunitárias de base celular, que não dependem dos anticorpos circulantes (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004).

Os monócitos são células de núcleo ovóide em forma de rim ou de ferradura, que representam o estágio mais maduro. Os monócitos do sangue representam uma fase na maturação da célula mononuclear fagocitária originada na medula óssea. Essa célula passa para o sangue, onde permanece por alguns dias, e atravessando a parede dos capilares e vênulas, penetram no tecido conjuntivo e em alguns órgãos, transformando-se em macrófagos, o que constitui uma fase mais avançada da célula mononuclear fagocitária. Assim, o monócito faz parte do sistema mononuclear fagocitário (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2004).

Consideradas células fagocíticas, os macrófagos desempenham o papel de células secretoras e regulatórias de processos imunes e inflamatórios. Possuem a capacidade de secretar um amplo número de substâncias que incluem enzimas, inibidores enzimáticos, proteínas do sistema complemento, dentre outros. Quando ativados, sofrem modificações morfológicas, metabólicas e funcionais, como: aumento de tamanho, alteração da membrana plasmática, maior formação de pseudópodos, aumento no número de vesículas pinocíticas, maior metabolismo de glicose, migração mais vigorosa, maior capacidade de matar microorganismos intracelulares facultativos e células tumorais (STITES, TERR., 1992).

Os mastócitos por sua vez, caracterizam-se por serem células globulosas, grandes, com o citoplasma carregado de grânulos que contém mediadores químicos da inflamação como a heparina, histamina, serotonina e fator quimiotático para neutrófilos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Eles estão localizados em órgãos como a pele, pulmões, vias gastrintestinais e mucosas nasais e estão estrategicamente posicionados para interagir com antígenos ingeridos ou inalados e secretar seu potente esquadrão de mediadores inflamatórios. São células do tecido conjuntivo e sua principal função é produzir e armazenar mediadores químicos no processo inflamatório, onde seu núcleo é esférico e central, onde os grânulos citoplasmáticos são eletrodensos e ligados a membrana. Durante a ativação dos mastócitos mediada por IgE, a estrutura cristalina dos grânulos citoplasmáticos de mastócitos humanos da pele e dos pulmões é perdida e isso ocorre devido a uma série de eventos que incluem o alargamento dos grânulos citoplasmáticos, solubilização granular e fusão de membrana de grânulos citoplasmáticos adjacentes com a membrana da superfície da célula (STITES & TERR., 1992).

As células endoteliais vasculares representam função ativa na inflamação, por secretarem óxido nítrico, que promove vasodilatação, aumento da liberação de plasma e de células sanguíneas para a área da inflamação (RANG *et al.*, 2007).

## B) Mediadores Químicos da Inflamação

Os mediadores podem estar presentes no plasma em formas precursoras que devem ser ativadas, ou podem estar presentes em células dentro de grânulos, como por exemplo, a histamina nos grânulos de mastócitos. Podem, também, ser sintetizados originalmente, tais como as prostaglandinas, em resposta a um estímulo adverso. Alguns mediadores exibem atividade enzimática direta, como as proteases lisossômicas, ou podem mediar uma lesão oxidativa, a exemplo dos metabólitos do oxigênio. Contudo, a maioria dos mediadores realiza atividade ligando-se a receptores específicos em células alvo.

Um mediador químico pode estimular a liberação de mediadores pelas próprias células-alvo, constituindo mecanismos por amplificação ou, neutralização dos mediadores iniciais. Eles podem atuar em um ou vários tipos celulares, possuir alvos difusos, ou ainda, apresentar efeitos diversos, de acordo com os tipos de células e tecidos. Os mediadores da dor inflamatória compreendem, portanto, os que causam sensibilização do nociceptor (hiperalgésicos) e os que ativam diretamente o nociceptor (COTRAN, KUMAR, COLLINS, 2000).

A bradicinina provoca vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Sua ação vasodilatadora se dá por produção de prostaglandina (PGI<sub>2</sub>) e liberação de óxido nítrico. Embora reproduza muitos sinais e sintomas inflamatórios, o seu papel na inflamação e na alergia não está claramente definido (RANG *et al.*, 2007).

O fator de ativação das plaquetas (PAF) é capaz de produzir uma variedade de sinais e sintomas da inflamação. É um potente agente quimiotático para neutrófilos e monócitos e pode ainda recrutar a enzima fosfolipase A<sub>2</sub>, e iniciar a síntese de eicosanóides (RANG *et al.*, 2007).

A histamina é um mediador pré-formado presente nos mastócitos e basófilos com um papel central nas reações de hipersensibilidade imediata. Este mediador também modula uma variedade de funções fisiológicas do SNC dos mamíferos, tais como sono / vigília, atenção, ansiedade, dor e percepção homeostase, equilíbrio de fluidos, apetite e da temperatura corporal (OGAWA *et al.*, 2009). E atua na dor inflamatória por ativação direta do nociceptor. Outros mediadores, como a substância P, a serotonina e a adenosina trifosfato (ATP) também participam da ativação direta do nociceptor. (RANG *et al.*, 2007).

As citocinas são mediadores protéicos, sendo produzidas e secretadas por tipos celulares diversos (linfócitos, macrófagos ativados, células do endotélio, epitélio e tecido conjuntivo) que modulam a função de células inflamatórias e do sistema imunológico.

Algumas citocinas além de exercerem ação inflamatória diretamente sobre as células induzem a formação de outros mediadores inflamatórios (RANG *et al.*, 2007).

A superfamília das citocinas inclui as interleucinas, que são produzidas por células hematopoiéticas e atuam primariamente sobre leucócitos, o fator de necrose tumoral (TNF), que induzem a formação de outras citocinas e as quimiocinas, que são citocinas que estimulam o movimento leucocitário (quimiocinese) e o movimento dirigido (quimiotaxia) (COTRAN, KUMAR, COLLINS, 2000). Elas induzem o rolamento e adesão de neutrófilos pela transmigração pelo espaço extravascular, onde esses dois fenômenos envolvem a participação de diferentes famílias de moléculas de adesão, incluindo selectinas, integrinas e imunoglobulinas (PANE, PERRY, GRANGER, 1999).

Os eicosanóides diferentemente da histamina, não são encontrados pré-formados nas células, mas são produzidos a partir de fosfolipídios quando há necessidade. O seu precursor é o ácido araquidônico, que é metabolizado por diversas vias, incluindo as seguintes: Ácido graxo cicloxigenase (COX), que apresentam duas isoformas (COX-1 e COX-2) e lipoxigenase, que sintetiza os leucotrienos.

A COX-1 está presente na maioria das células como uma enzima constitutiva produtora de prostanóides que atuam como reguladores homeostáticos, enquanto que a COX-2, não se encontra normalmente presente, porém é fortemente induzida por estímulos inflamatórios e por isso acredita-se que ela é mais relevante para a terapia da inflamação. Ambas as enzimas formam os endoperóxidos PGG<sub>2</sub> e PGH<sub>2</sub>, que dão origem aos prostanóides (prostaglandinas e tromboxanos) (RANG *et al.*, 2007).

A resposta inflamatória é inevitavelmente acompanhada pela liberação de prostanóides. Estes últimos não aumentam diretamente a permeabilidade das vênulas pós-capilares, porém potencializam efeito da histamina e da bradicinina. Não produzem dor, mas potencializa esse efeito da bradicinina ao sensibilizar as fibras C aferentes aos efeitos de outros estímulos nocivos. Os leucotrienos provocam aderência, quimiotaxia e ativação e monócitos e neutrófilos, além de estimular a proliferação de macrófagos e linfócitos e por conseqüência, produção de citocinas (RANG *et al.*, 2007).

### 1.6.3. Fármacos utilizados na Dor e na Inflamação

Testes com fármacos analgésicos utilizando animais, permitem avaliar a nocicepção, determinando as reações dos mesmos a um estímulo doloroso, com freqüência mecânica ou térmica (SILVA, 2008).

O termo opióide, vem do ópio, que por sua vez, contém muitos alcalóides relacionados à morfina, por isso esse termo aplica-se a qualquer substância, endógena ou sintética, que produza efeitos semelhantes à morfina, por isso aplica-se a qualquer substância, endógena ou sintética, que produza efeitos semelhantes à morfina e que sejam bloqueados por antagonistas como naloxona. Os opióides apresentam 3 tipos de receptores:

- 1) Receptor  $\mu$ , que é responsável pela maioria dos efeitos analgésicos;
- 2) Receptor  $\delta$ , que são mais importantes a nível periférico, mas também pode contribuir para a analgesia;
- 3) Receptor  $\kappa$ , que contribui para analgesia a nível espinhal e podem desencadear sedação e disforia, mas produzem menos efeitos adversos e não contribuem para a dependência.

Os receptores  $\sigma$  não são verdadeiros receptores de opióides, mas se encontram em locais de interação de alguns opióides.

Os opióides variam não somente em sua especificidade para os receptores, mas também em sua eficácia nos diferentes tipos de receptor. Deste modo, alguns agentes atuam como agonistas em um tipo de receptor e como antagonista em outro. Os agonistas puros são substâncias semelhantes à morfina e têm afinidade pelos receptores  $\mu$  e em geral, afinidade mais baixa pelos sítios  $\delta$  e  $\kappa$ .

As substâncias semelhantes à morfina produzem analgesia através da ação predominante no sistema nervoso central, enquanto os agentes semelhantes à aspirina (Indometacina) e os anestésicos locais atuam predominantemente a nível periférico.

A morfina é um opióide que promove analgesia intensa e de longa duração, sem provocar bloqueio simpático ou motor, além de ser antinociceptiva, a morfina também reduz o componente afetivo da dor. (RANG *et al.*, 2007)

Por outro lado, a morfina ocasiona alguns efeitos indesejáveis, como: euforia, náuseas, vômitos, depressão respiratória, dependência física e psicológica, redução da motilidade gastrointestinal e espasmo do músculo liso, levando a constipação e algumas vezes espasmo biliar e uretral (SILVA, SAKATA, ISSY, 2004).

Assim, derivados opióides são indicados no tratamento de dores agudas, moderadas ou intensas, que não respondem a analgésicos menos potentes ou que, por sua natureza, não são eles suscetíveis. Também são eficazes no controle da dor crônica, sendo a tolerância e a dependência física fatores limitantes do seu uso prolongado (FUCHS, WANNAMACHER, 1998).

Os antagonistas puros bloqueiam os receptores  $\mu$ ,  $\delta$  e  $\kappa$  mais ou menos igualmente. Os antagonistas seletivos estão disponíveis como instrumentos experimentais.

A naloxona foi o primeiro antagonista puro de opióides, tendo afinidade por todos os três receptores de opióides. Bloqueia as ações dos peptídeos opióides endógenos, bem como as dos fármacos semelhantes à morfina e tem sido extensamente usada como padrão para determinar se a analgesia é mediada por um mecanismo opióide, particularmente na transmissão da dor (PICOLO, GIORGI, CURY, 2000).

Inicialmente a naloxona produz muito pouco efeito em indivíduos normais, mas produz reversão rápida dos efeitos da morfina e de outros opiáceos, incluindo os antagonistas parciais, como a pentazocina. Ou seja, tem pouco efeito sobre o limiar doloroso sob condições normais, mas causa hiperalgesia sob condições de estresse ou inflamação, quando são produzidos opióides endógenos. Também inibe a analgesia produzida por estimulação da área cinzenta periaquedutal. Os principais usos clínicos da naloxona são para tratar a depressão respiratória causada pela superdosagem de opiáceos. É rapidamente metabolizada pelo fígado e seu efeito dura de 2 a 4 horas, inferior a fármacos semelhantes à morfina. A naloxona precipita os sintomas de abstinência em pacientes ou animais dependentes de morfina (RANG *et al.*, 2007).

Os principais grupos de fármacos que são usados nos distúrbios inflamatórios são os antiinflamatórios não-esteroidais (AINES), anti-reumatóides e os glicocorticóides.

Os AINES apresentam efeito analgésico em casos de dor inflamatória, já que diminuem a produção das prostaglandinas que sensibilizam os nociceptores a mediadores inflamatórios, como a bradicinina. Em combinação com opióides, diminuem a dor do pós-operatório e em alguns casos, podem reduzir a necessidade de opióides em até um terço. Reduzem os componentes da resposta inflamatória (dor, aumento do fluxo sanguíneo e edema) na qual as prostaglandinas, principalmente as derivadas da COX-2 desempenham papel significativo (RANG *et al.*, 2007).

Os AINES normalmente inibem facilmente a COX-1, porém, inibir a COX-2 é mais dependente de tempo e a inibição costuma ser irreversível.

Os AINES seletivos para a COX-2 incluem a aspirina, com uma atividade antiinflamatória importante, o paracetamol, que apresenta fraca atividade antiinflamatória, porém com menores efeitos adversos como a nível gástrico ou plaquetário e os coxibes, sendo que estes últimos apresentam maiores efeitos adversos.

Dentre os AINES seletivos para COX-2, a indometacina destaca-se como importante ferramenta farmacológica atuando em modelos clássicos de nocicepção e inflamação utilizando animais em laboratório.

A indometacina é um fármaco derivado do ácido indolacético pertencente à categoria dos antiinflamatórios não esteroidais, que apresenta propriedades antiinflamatória, analgésicas e antipiréticas, já que inibe a enzima COX-2, necessária para a formação de PG's e outros autacóides (RAFFIN *et al.*, 2003).

Também inibe a motilidade dos leucócitos polimorfonucleares. É usado efetivamente em disfunções do sistema locomotor, porém, assim como outros AINES, é fortemente limitada pelos efeitos locais do sistema gastrointestinal, que podem gerar ulcerações e/ou hemorragias, devido à produção de grupos ácidos pelos AINES e pela inibição da síntese de PG's pela mucosa gástrica (BONINA *et al.*, 1997).

A busca incansável de substâncias eficazes no controle da dor e da inflamação, com mínimos efeitos colaterais, tem despertado em muitos pesquisadores o interesse por vegetais como fonte desses compostos. Assim, o conhecimento empírico ainda hoje pode ser considerado um dos grandes fatores de contribuição de muitas descobertas científicas. A importância de substâncias ativas derivadas de plantas no desenvolvimento de fármacos pode ser comprovada pela utilização da morfina, quinina, dicumarol, digitoxina, atropina e outros. Isto tudo, sem mencionar que a descoberta da atividade de algumas substâncias também tem favorecido novas possibilidades de intervenções terapêuticas.

Atualmente, é dada grande ênfase a estudos de substâncias naturais que possam potencialmente apresentar atividade terapêutica e, claramente, venham representar uma alternativa eficaz, segura e menos onerosa à população. Assim, essas substâncias, dentre elas, as lectinas de algas marinhas, vêm se tornando fontes importantes de novos fármacos com potencial efeito analgésico e/ou antiinflamatório.

Assim, têm sido de interesse de muitos pesquisadores, para otimizar a reabilitação de lesões, a utilização de biomateriais, compreendidos como materiais interativos capazes de estabelecer uma afinidade apropriada com o tecido vizinho sem a indução de uma resposta adversa do hospedeiro (RATNER, BRYANT, 2004).

## 2- OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Avaliar as atividades antinociceptiva e antiinflamatória da lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* em modelos clássicos de nocicepção e inflamação.

### 2.2. Específicos

Extrair e purificar a lectina da alga marinha verde *C. cupressoides* através de procedimentos de cromatografia de troca iônica e afinidade;

Investigar o potencial antinociceptivo da lectina *C. cupressoides* através dos testes de contorções abdominais induzidos por ácido acético, placa quente e formalina em camundongos;

Avaliar a atividade antiinflamatória da lectina *C. cupressoides* através do ensaio de migração de leucócitos em ratos;

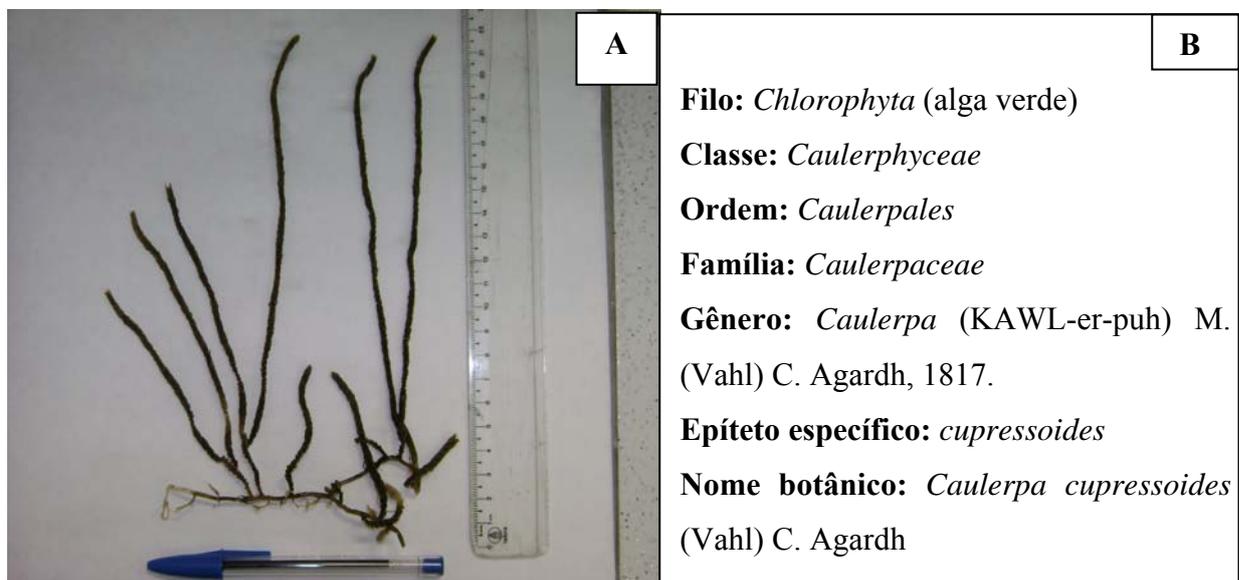
Avaliar parcialmente a toxicidade aguda por dose repetida da lectina *C. cupressoides* em camundongos.

### 3. MATERIAIS

#### 3.1. Algas Marinhas

As algas marinhas utilizadas foram coletadas em rochas do meso-litoral, durante maré baixa (-0,2 a 0,2 m) na Praia do Pacheco, município de Caucaia-CE.

A espécie *Caulerpa cupressoides* var. *lycopodium*, foi identificada e uma exsicata foi depositada no Herbário Prisco Bezerra sob o número 4977, na Universidade Federal do Ceará.



**Figura 1:** Aspecto macroscópico da Alga marinha *Caulerpa cupressoides* (A) e sua classificação taxonômica (B) (JOLY, 1965).

#### 3.2. Células Sanguíneas

Para determinação da atividade hemaglutinante, amostras de sangue foram obtidas de coelho albino *Nova Zelândia* adulto e sadio, com massa corpórea variando entre 2 e 3 quilogramas, mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

#### 3.3. Animais

Foram utilizados camundongos albinos *Swiss*, com massa corpórea variando entre 18 e 25 gramas, e ratos albinos *Wistar*, com massa corpórea variando entre 120 e 160 gramas, fornecidos pelo biotério central do Campus do Pici-UFC e pelo biotério setorial do

Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Os animais receberam água e alimentação *ad libitum*. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados.

Os ensaios com os animais seguiram os padrões exigidos de ética e biossegurança, acreditando na sua aprovação justa. Considerou-se este trabalho como parte integrante do projeto intitulado “Compostos Bioativos de Algas Marinhas: Bases Moleculares, Implicações Terapêuticas e Industriais”, que devido a sua relevância e respeito aos princípios dos 3 R’s da experimentação animal (“reduction, replacemaent and refinemaent”), recebeu aprovação da Comitê de Ética de Pesquisa com Animais de laboratório da UFC (CEPA nº 125/07).

### 3.4. Soluções, Drogas e Corantes

Todos os reagentes utilizados apresentaram grau de pureza e propriedades analíticas adequadas. As drogas e reagentes utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho foram:

Reagentes usados na eletroforese: Acrilamida, N,N-metileno bisacrilamida, TEMED, Coomassie Brilliant Blue G-250,  $\beta$ -mercaptoetanol, tripsina, foram obtidos de Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.; Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e DEAE-Celulose, pela Sigma, USA.

Marcadores para eletroforese: Fosforilase b (97,0 kDa); Albumina sérica bovina (66,0 kDa); Ovoalbumina(45,0 kDa); Anidrase carbônica (30,0 kDa); Inibidor de tripsina (20,1 kDa); Lactoalbumina (14,4 kDa); Sigma Chemical Co., St. Louis, U.S.A.

Álcool comercial; Azul de Evans (Sigma); Hematoxilina e Eosina (Reagen); Cloreto de Sódio (NaCl), Tris-HCl, KCl,  $MgCl_2$ ,  $NaH_2PO_4^-$ ,  $NaHCO_3^-$ ,  $CaCl_3$  (Merck).

Soluções e Drogas usadas na nocicepção: Ácido acético (PA, Merck); Formaldeído 38% (PA, Merck), ambos dissolvidos em água destilada.

Naloxona (Narcan<sup>®</sup>, Rhodia; São Paulo, SP, Brasil); Cloridrato de Morfina (Dimorf<sup>®</sup>, Cristália, Itapira, SP, Brasil); Indometacina dissolvida em solução salina 0,9% contendo 5% de bicarbonato de sódio (Indocid<sup>®</sup> Merck Sharp & Dohme; Campinas, SP, Brasil).

Soluções e Drogas usadas no ensaio de inflamação: Carragenina lambda tipo IV (Sigma, St. Louis, MO, USA); Dexametasona (Decadron<sup>®</sup>, Anápolis, GO, Brasil).

Kits para dosagens séricas: TGO; TGP (Cat. 52 e 53, ANVISA 10009010031 e 10009010027, respectivamente); Uréia (Cat. 27, ANVISA 10009010011), (Labtest<sup>®</sup>, Lagoa Santa, MG, Brasil). Quando necessário, hidrato de cloral (Vetec; Rio de Janeiro, RJ, Brasil) foi usado para anestesiá-los os animais.

## 4. MÉTODOS

### 4.1. Isolamento da Lectina da Alga Marinha *C. cupressoides*

O isolamento da lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* foi realizado através de algumas adaptações à metodologia descrita por Benevides *et al.*, 2001. (Figura 2).

#### 4.1.1. Preparação do Extrato Bruto

Após descongelamento e secagem em papel de filtro, amostras de 500 g de alga fresca foram trituradas em almofariz de porcelana na presença de nitrogênio líquido e submetidas a extração das proteínas solúveis com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 (TB), na proporção de 1:4 (m/v; alga:tampão). Após agitação constante por 4 horas, o homogenato foi filtrado em tecido de nylon e em seguida centrifugado a 6.000 x g por 30 minutos a 4 °C. O precipitado foi desprezado e o sobrenadante obtido, denominado de extrato total.

#### 4.1.2. Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose

O extrato total obtido foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose. A coluna foi equilibrada com TB e o extrato previamente dialisado contra o mesmo tampão foi aplicado na coluna. Após completa eluição da fração não retida na coluna com o tampão de equilíbrio, foi realizada a eluição da fração adsorvida na matriz por adição de NaCl 0,5 M ao tampão de equilíbrio. Foi mantido um fluxo constante de 30 ml/ hora, coletando frações de 3 ml por tubo e as absorbâncias lidas a 280 nm. As frações obtidas foram concentradas por liofilização parcial.

#### 4.1.3. Cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-100

A fração ativa contendo atividade hemaglutinante obtida na cromatografia de DEAE-celulose foi submetida à cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de Sephadex G-100 equilibrada com TB. Após completa eluição da fração não retida na coluna com o tampão de equilíbrio, foi realizada a eluição da fração adsorvida na matriz por adição de glicose 0,1 M ao tampão de equilíbrio. Foi mantido um fluxo constante de 30 ml/ hora, coletando frações de 3 ml por tubo e as absorbâncias lidas a 280 nm. A fração retida (PII) após diálise contra ácido

acético 0,1 M seguida de diálise contra água destilada foi utilizada para determinação da atividade hemaglutinante e liofilizada para posteriores determinações das atividades farmacológicas.

#### **4.2. Eletroforese em gel de Poliacrilamida em presença de SDS e de $\beta$ - mercaptoetanol**

A pureza da lectina (PII- Sephadex G-100) de *C. cupressoides* foi revelada por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e  $\beta$ -Mercaptoetanol, segundo o método descrito por LAEMMLI (1970) adaptado para o uso em placas de vidro (10,2 x 8,4).

Para montagem das placas, foi usado um gel de concentração contendo 3,95% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e um gel de separação contendo 12,5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 3,0 M, pH 8,8. As amostras liofilizadas foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 6,8, contendo glicerol, SDS 1%,  $\beta$ -mercaptoetanol 1% e azul de bromofenol. Em seguida, as amostras foram incubadas a 100 °C por 10 minutos. Alíquotas de 10 e 20  $\mu$ l foram aplicadas para a corrida em uma corrente de 40 mA por 1 hora, usando uma fonte regulável de corrente contínua. O coramento das proteínas foi realizado com uma solução de Coomassie Brilliant Blue R-250, contendo: 0,25% em metanol, ácido acético e água (4:0,7:5,3 v/v/v) por um período de 18 horas. O descoramento foi feito em uma solução de metanol, ácido acético e água (3,5:1:8,0 v/v/v). Para revelação das bandas protéicas, o método picrato-Coomassie Blue foi usado como descrito por Stephano (1986).

#### **4.3. Determinação de Proteínas**

As dosagens de proteínas solúveis nas diversas etapas de purificação da lectina de *C. cupressoides* foram realizadas segundo o método de Bradford (1976).

As absorbâncias foram lidas a 595 nm em espectrofotômetro Micronal modelo B 343 II. A concentração de proteínas foi estimada com relação a uma curva padrão obtida com albumina sérica bovina (BSA).

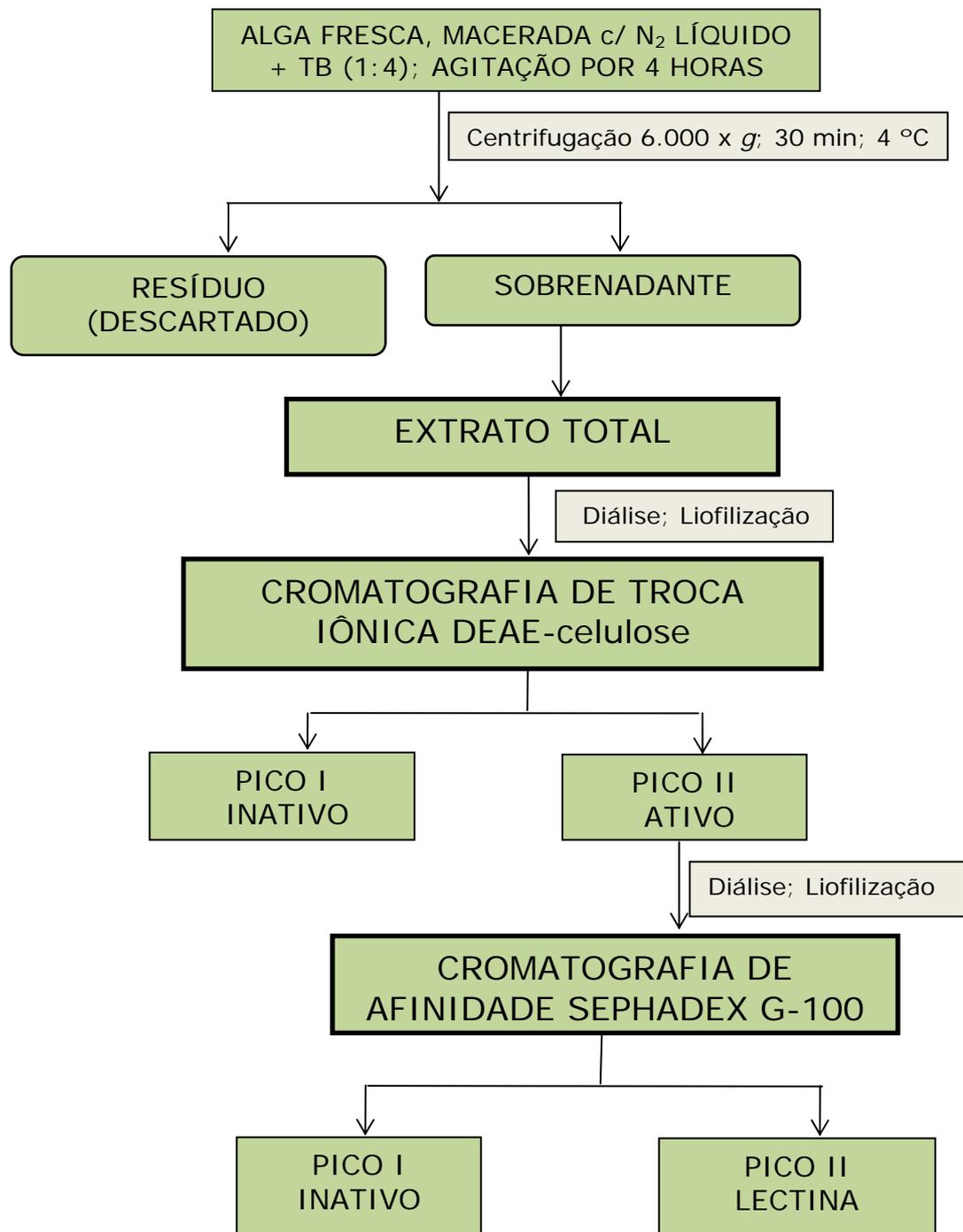


Figura 2: Esquema de extração e purificação da alga marinha verde *C. cupressoides*.

#### 4.4. Determinação da Atividade Hemaglutinante

Os ensaios de atividade hemaglutinante foram feitos através de diluições seriadas em tubos de ensaio. Em cada tubo foram adicionados 100 µl de NaCl 0,15 M. No primeiro tubo foram adicionados 100 µl da amostra e uma série de diluições duplas foram feitas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, etc.), homogeneizando-se completamente antes de cada transferência. A cada diluição foram adicionados 100 µl de eritrócitos tripsinizados de coelho a 2% e a reação foi incubada à temperatura ambiente por 60 minutos. Posteriormente, o ensaio foi centrifugado a 2.000 x g por 30 segundos e os resultados foram lidos macroscopicamente, sendo o título expresso em unidade de hemaglutinação (UH/ml), que é o inverso da maior diluição da amostra que apresentou nítida aglutinação.

#### 4.5. Atividades Antinociceptiva e Antiinflamatória

##### 4.5.1. Testes de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético

O modelo de contorções abdominais, inicialmente proposto para ratos, foi modificado para camundongos por KOSTER *et al.* (1959).

O teste de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético é um modelo clássico de nocicepção periférica, onde após a injeção intraperitoneal do agente nociceptivo, observam-se respostas que consistem em uma seqüência de contorções no abdômen acompanhadas por extensão dos membros inferiores.

Assim, os grupos testados receberam 30 minutos antes da aplicação do ácido: Solução salina 0,9% (via i.v.); Morfina, um analgésico opióide, na dose de 5 mg/kg (via s.c.); Indometacina, um AINE, na dose de 5 mg/kg ; s.c.; Lectina *Caulerpa cupressoides*, representada por LCc nas doses de 3, 9 e 27 mg/kg ; i.v.; LCc na dose de 27 mg/kg ; i.v. ligada a Mucina (açúcar inibidor de sua atividade hemaglutinante); ou apenas Mucina na concentração de 2 mg/ml ; i.v.

Trinta minutos após a administração dos compostos a serem testados, foi feita a injeção do estímulo nociceptivo, ou seja, injeta-se ácido acético 0,8% na cavidade peritoneal dos animais (0,1 ml/10 g de peso do animal). Após administração do ácido acético inicia-se a contagem das contorções, durante 30 minutos.

Esta irritação local desencadeia a liberação de vários mediadores como a bradicinina, substância P e prostaglandinas, bem como citocininas. Estes mediadores ativam nociceptores quimiossensíveis que contribuem com o desenvolvimento da dor de origem inflamatória. Embora sendo um modelo pouco específico, apresenta boa sensibilidade, sendo dessa forma uma ferramenta importante para a avaliação da atividade analgésica e antiinflamatória de novos compostos (IKEDA *et al.*, 2001).



**Figura 3: Aspecto de um camundongo apresentando contorção abdominal seguida por extensão das patas posteriores induzida por ácido acético 0,8 % no ensaio de Contorções Abdominais.**

#### 4.5.2. Teste da Formalina

Caracteriza-se por apresentar resposta bifásica distinta, sendo a primeira fase considerada neurogênica e a segunda inflamatória em resposta a um estímulo químico (BRAGGIO *et al.*, 2002).

O teste consiste de duas diferentes fases. A primeira (fase neurogênica) é gerada na periferia por ativação de neurônios nociceptivos por ação direta da formalina e a segunda fase (fase inflamatória) ocorre por ativação de neurônios ventrais à nível da medula espinhal (RIDTITID *et al.*, 2008).

A fase tardia é devido à inflamação decorrente de liberação de mediadores inflamatórios, tais como serotonina, histamina, bradicinina e prostaglandinas, que pelo menos em algum grau poder causar a sensibilização de neurônios nociceptivos centrais (VERMA *et al.*, 2005).

Nesse experimento, que seguiu o modelo de Hunskaar *et al.* (1985); grupos de animais receberam 30 minutos antes da injeção de formalina: Solução Salina 0,9% ; i.v.; Lectina *Caulerpa cupressoides*, representada por LCc nas doses de 3, 9 e 27 mg/kg ; i.v.; LCc na dose de 27 mg/kg ; i.v.); ligada a Mucina (açúcar inibidor de sua atividade hemaglutinante); ou apenas Mucina na concentração de 2 mg/ml ; i.v.; Indometacina, um AINE, na dose de 5 mg/kg ; s.c.; Morfina, um analgésico opióide, na dose de 5 mg/kg ; s.c.); Naloxona, um antagonista opióide na dose de 2 mg/kg ; s.c.) foi aplicada 15 minutos antes da aplicação de morfina ou da LCc na dose de 27 mg/kg. Foi registrado o tempo gasto (s) pelo animal lambendo a pata durante dois períodos após a injeção intraplantar de 20µl de solução de formalina 1% (v/v), na pata traseira direita do animal: de 0-5 min (fase inicial) e de 20-25 min (fase tardia).



**Figura 4: Aspecto de um camundongo lambendo a pata traseira após aplicação de formalina 1%.**

#### 4.5.3. Teste da Placa Quente

A atividade analgésica central pôde ser avaliada pelo teste da placa quente, segundo o método de Eddy e Leimbach (1953), que consiste na colocação de animais, normalmente camundongos, sobre uma placa aquecida de metal ( $51\pm 1$  °C) para observar por quanto tempo os animais levaram para manifestar uma resposta, que corresponde ao ato de retirar ou lamber a pata traseira e/ou saltar. Este teste é específico para verificar nocicepção central.

Os animais primeiramente foram familiarizados com a placa quente, para observação do tempo de reação controle. Os animais que apresentaram um tempo de reação superior a 10 segundos foram descartados do teste.

Grupos de animais receberam 30 minutos antes do estímulo térmico: Solução salina 0,9%; i.v.; Morfina, um analgésico opióide, na dose de 5 mg/kg ; s.c.; Indometacina, um AINE, na dose de 5 mg/kg ; s.c. ou LCc na dose de 27 mg/kg ; i.v.

As medidas do tempo de resposta foram registradas em intervalos de 30 minutos após a administração durante 90 minutos (tempos: 30 min; 60 min e 90 min) com um tempo de corte de 40 segundos.



**Figura 5: Aspecto do animal durante o teste da Placa Quente.**

#### 4.5.4. Ensaio de Migração de Neutrófilos Induzida por Carragenina

Para avaliar seu efeito antiinflamatório, foi realizado o ensaio de migração de neutrófilos induzida pelo agente causador de inflamação carragenina em ratos.

Os animais (ratos *Wistar* machos) receberam por via i.p, o estímulo inflamatório por Carragenina (Cg) (700 µg/cavidade) dissolvida em salina estéril. Após 4 horas da injeção de carragenina, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

Em seguida, o líquido da cavidade peritoneal foi coletado através de uma lavagem, por injeção de 10 ml de salina (NaCl 0,15 M), contendo 5 UI/ml de heparina. Os abdomens dos

animais foram levemente massageados e através de uma incisão foram recuperados entre 7 e 10 ml de fluido peritoneal, com pipeta Pasteur plástica.

Três grupos de animais receberam 30 minutos antes do estímulo inflamatório: Solução Salina 0,9% (i.v.); Dexametasona (Dexa 1 mg/kg; s.c.) ou LCc na dose de 9 mg/kg ; i.v. Um grupo adicional recebeu apenas Solução Salina 0,9% ; i.v. sem Cg.

A contagem total dos leucócitos foi realizada conforme metodologia descrita anteriormente por Souza e Ferreira (1985). Neste procedimento, 20 µl do fluido coletado de cada animal foi diluído em 380 µl do reagente de Turk e posteriormente usado 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 µl do exsudato foi centrifugado em citocentrífuga durante 10 min. Após este processo, os esfregaços foram corados pelo método de Hematoxilina-Eosina (HE) e as células contadas através de microscopia óptica. Os resultados foram expressos como média ± e.p.m. do número de células x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup> de fluido peritoneal.

#### 4.5.5. Avaliação parcial da Toxicidade Aguda por Dose Repetida

Para uma avaliação preliminar das propriedades tóxicas, a LCc foi administrada em um período de curta duração. Dessa forma, camundongos machos foram tratados com doses repetidas de 9 mg/kg ; i.v, durante sete dias consecutivos em grupos de seis animais, rigorosamente pesados, sendo mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica com livre acesso à água e ração.

Durante este período, foram observados sinais físicos como coçar nariz, lamber as patas, rodopiar, ereção de pêlos, além de sinais comportamentais, como apatia e/ou agressividade.

No oitavo dia, os animais foram anestesiados e amostras de sangue do olho foram coletadas e centrifugadas para a obtenção do plasma para posteriores dosagens séricas das atividades das Transaminases Glutâmico Oxalacética e Pirúvica (TGO e TGP) e de Uréia.

Em seguida, os camundongos foram mortos por deslocamento cervical, seguido da retirada dos órgãos (fígado, rim direito e coração), para posterior pesagem, mantendo correlações com as respectivas massas corpóreas. Todos os parâmetros toxicológicos observados foram comparados a de animais normais que receberam apenas Solução Salina (NaCl 0,15 M), nas mesmas condições que os animais tratados.

A dosagem de uréia tem a finalidade de observar possíveis alterações na função renal dos animais, ou para confirmar e/ou avaliar a evolução de uma patologia que afete a função dos rins. Após administração diária de LCc (9 mg/kg; i.v) durante os sete dias, obteve-se o plasma a partir do sangue coletado e desse total, 10 µl de cada animal foi utilizado para a dosagem de uréia, segundo a metodologia descrita no Kit da Labtest® e utilizado absorvância de 600 nm em espectrofotômetro Spectronic 20. Esta metodologia baseia-se em um sistema enzimático-colorimétrico, cuja intensidade da cor formada é proporcional à quantidade de uréia na amostra.

A enzima Transaminase Glutâmico Oxalacética (TGO/AST) é uma enzima liberada no sangue quando ocorre uma lesão hepática. Do mesmo modo, a enzima Transaminase Glutâmico Pirúvica (TGP/ALT) também é liberada no sangue quando ocorre lesão hepática. Portanto, sua mensuração pode ser um indicador de comprometimento hepatocelular agudo.

O procedimento para a dosagem da enzima Transaminase Glutâmico Oxalacética (TGO/AST) consistiu em adicionar 50 µl do substrato TGO (solução de 0,2 M de L-aspartato, 0,002 M  $\alpha$ -cetogluturato, tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 e em seguida, colocá-lo em banho-maria a 37 °C por 2 min, seguido da adição de 50 µl da amostra (plasma) de cada animal e incubado a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado 50 µl do reagente de cor (solução 0,001 M de 2,4 Dinitrofenilhidrazina), homogeneizado e deixado em repouso à temperatura ambiente (20-30 °C), durante 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 500 µl de hidróxido de sódio 0,4 M e a solução foi deixada em repouso durante 5 minutos, a temperatura ambiente (20-30 °C). As absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro a 505 nm.

Para a dosagem de Transaminase Glutâmico Pirúvica (TGP/ALT), o procedimento consistiu em adicionar 50 µl de substrato TGP (solução de 0,2 M de L-alanina, 0,002 M  $\alpha$ -cetogluturato, tampão de fosfatos 0,1 M pH 7,4) e colocação em banho-maria a 37 °C, seguido da adição de 50 µl da amostra (plasma), homogeneizado e incubado a 37 °C durante 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado 50 µl do reagente de cor (solução 0,001 M de 2,4 Dinitrofenilhidrazina), homogeneizado e deixado em repouso à temperatura ambiente (20-30°C), durante 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 500 µl de hidróxido de sódio 0,4 M e a solução deixada em repouso durante 5 min, a temperatura ambiente (20-30 °C). As absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro Spectronic 20 a 505 nm.

#### **4.6. 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. Foi considerado significativo  $p < 0,05$ .

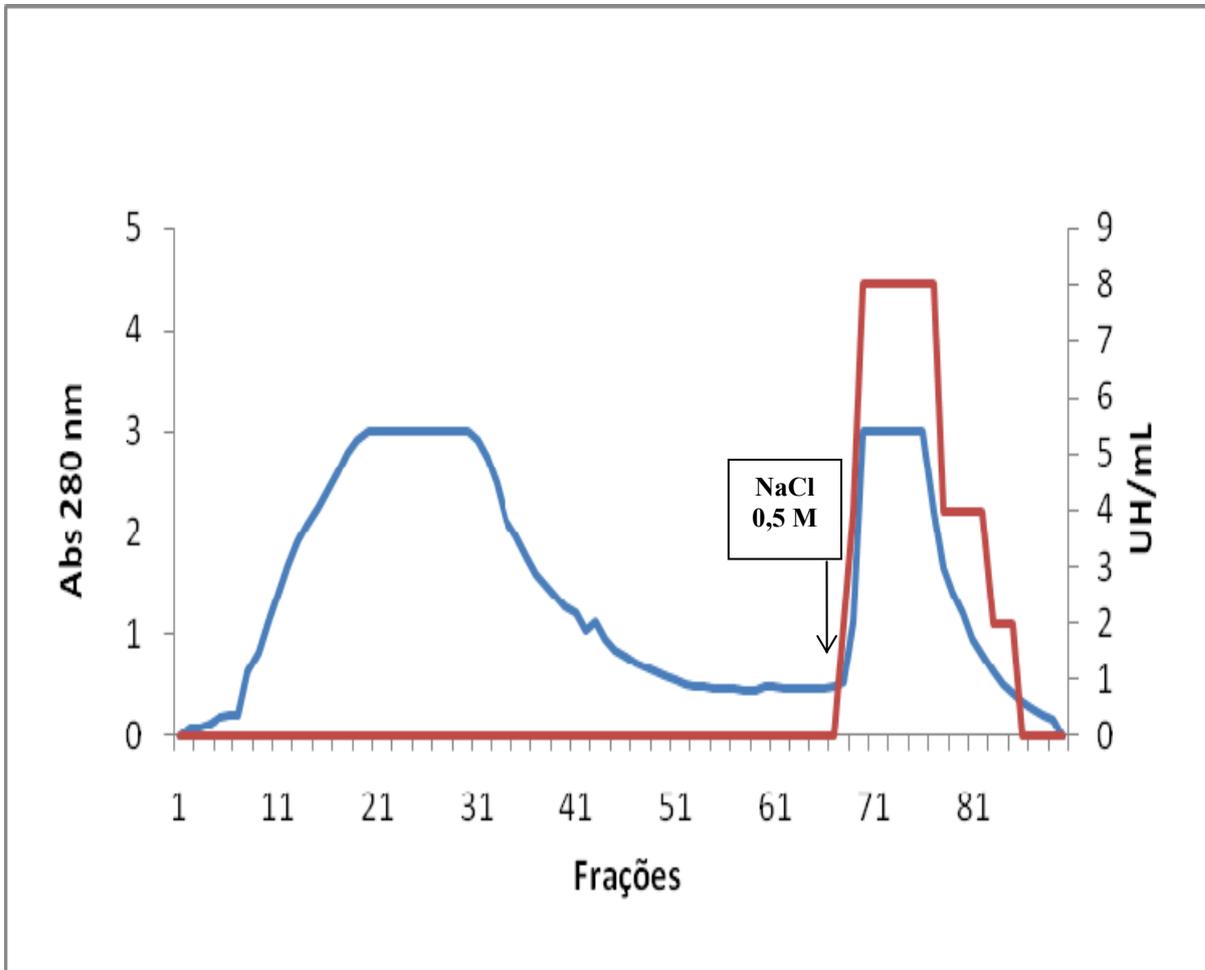
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Extração e purificação da LCc

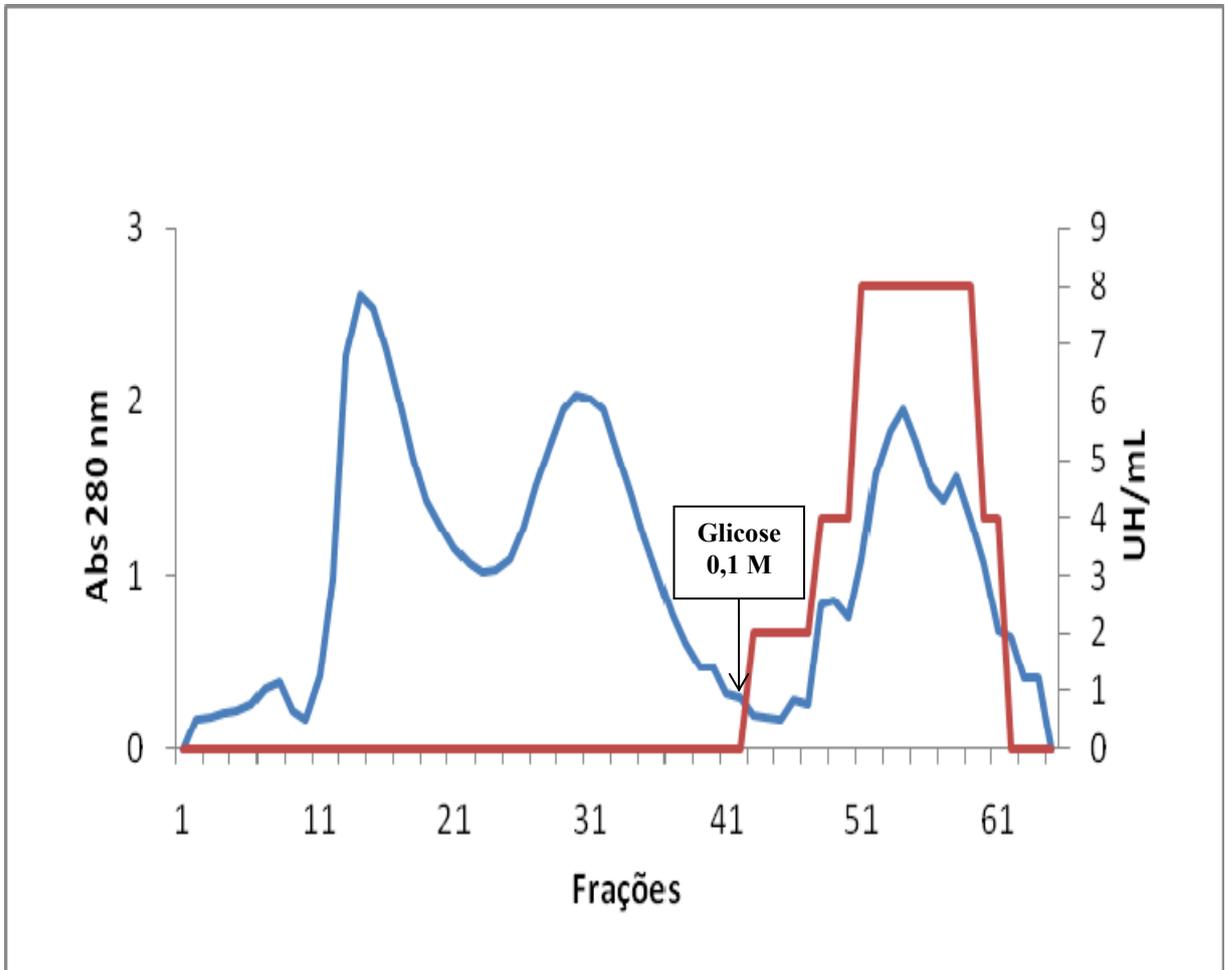
A lectina da alga *C cupressoides* (LCc) foi purificada por aplicação do extrato total em cromatografias seqüenciais de troca-iônica e afinidade em colunas de DEAE-celulose e Sephadex G - 100, respectivamente. O procedimento de troca-iônica mostrou a presença de dois picos protéicos, onde o primeiro (PI) pigmentado, não retido na coluna e livre de atividade hemaglutinante foi eluído com TB. O segundo pico (PII) foi eluído com o mesmo tampão, contendo 0,5 M de NaCl apresentando-se levemente pigmentado e com atividade hemaglutinante (Figura 6). O PII obtido foi dialisado contra água, liofilizado e aplicado em coluna de afinidade (Sephadex G-100) equilibrada com TB sendo os picos isentos de atividade hemaglutinante, eluídos com o tampão de equilíbrio e o pico contendo atividade hemaglutinante, eluído com glicose 0,1 M (Figura 7).

A descoberta de que as lectinas podiam ser isoladas por cromatografia de afinidade em colunas contendo o açúcar ligante, foi feita por Agraw e Goldstein (1965), que descreveram um método pioneiro de purificação de lectinas baseando-se na especificidade de ligação aos carboidratos. A Concanavalina A (Con A), uma lectina com especificidade de ligação a D-glicose, foi purificada através da adsorção específica em coluna de Sephadex-Dextran, seguida de eluição com solução de D-glicose (SELL; COSTA, 2000).

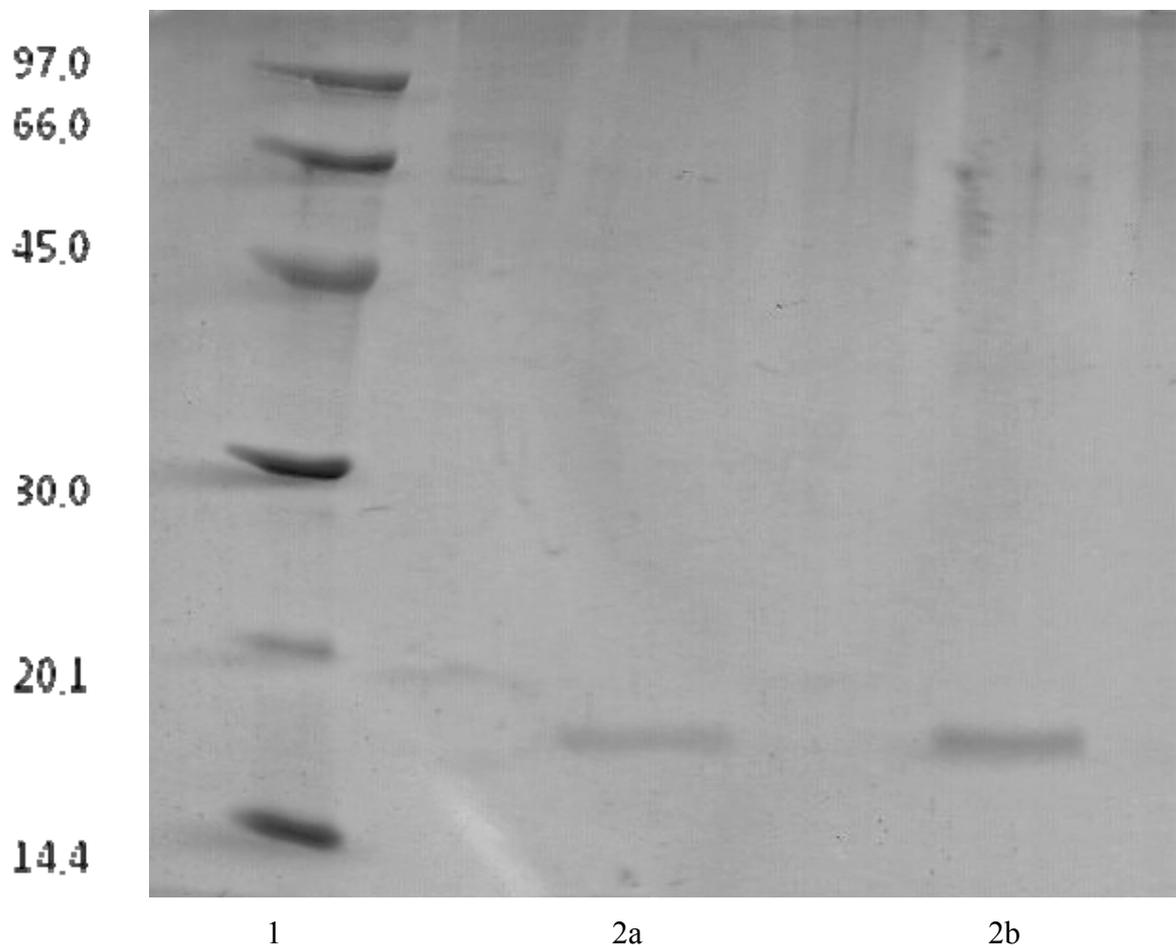
A pureza da lectina *Caulerpa cupressoides* foi comprovada pela utilização de PAGE-SDS em presença do agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol onde esta apresentou uma massa molecular aparente de 17 kDa, estabelecida por regressão linear em relação aos padrões protéicos (Figura 8). Resultado semelhante foi obtido por Benevides *et al.* (2001), que encontrou uma única banda protéica de 23 kDa também na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol, confirmando a baixa massa molecular da lectina.



**Figura 6: Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE- Celulose do extrato total da alga *C. cupressoides* equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. As frações foram eluídas com tampão Tris-HCl 25 mM , pH 7,5 e com Tris-HCl 25 mM , pH 7,5 contendo NaCl 0,5 M. Frações 3 ml/tubo ( ---- )  $A_{280}$  e atividade hemaglutinante ( - - - - ).**



**Figura 7:** Cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-100 do PII da DEAE-celulose, equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. O pico ativo foi eluído com glicose 0,1 M, Frações 3 ml/tubo ( - - - - )  $A_{280}$  e atividade hemaglutinante ( - - - - ).



**Figura 8: Eletroforese PAGE-SDS em presença de 2-mercaptoetanol da lectina da alga *C. cupressoides*.** 1. Marcadores (Fosforilase b: 97,0; Albumina: 66,0; Ovalbumina: 45,0; Anidrase Carbônica: 30,0; Inibidor de tripsina: 20,1 e  $\alpha$ -lactoalbumina: 14,4 kDa) 2. Lectina na presença de 2-mercaptoetanol (2a: 10 $\mu$ l e 2b: 20  $\mu$ l).

Foram obtidas 0,5 mg de lectina a partir de 185 mg de extrato bruto após os procedimentos de purificação. Este rendimento protéico é considerado comum na obtenção de lectinas de algas marinhas.

Foi observado que, apenas 0,11 microgramas de lectina foram necessários para promover hemaglutinação (Tabela 1.1). BENEVIDES *et al.* (2001) isolaram a LCc utilizando no esquema de purificação o procedimento de cromatografia de afinidade em coluna de  $\alpha$ -lactose-agarose (Sigma) seguida da cromatografia de exclusão molecular em coluna de Bio Gel P-100 e também apresentou um rendimento protéico semelhante, porém necessitou de uma maior quantidade de lectina para promover hemaglutinação (Tabela 1.2).

Desta forma, a metodologia atual de purificação da LCc, utilizando procedimentos seqüenciais de troca iônica e de afinidade, mostrou-se mais eficaz, já que apesar do rendimento semelhante, o resultado apresentado mostrou uma menor concentração de lectina capaz de aglutinar uma suspensão de eritrócitos tripsinizados de coelho.

**Tabela 1.1 - Purificação da lectina da alga marinha vermelha *C. cupressoides* por Cromatografias de troca iônica e de afinidade.**

Frações	Proteína Total (mg)	Atividade Hemaglutinante (unidades/mg)			CMA <sup>a</sup>
		Total (UH)	Específica	(%)	
Extrato Bruto	185,0	12.167	66	100	15
DEAE-celulose	11,0	6.755	614	55,5	1,6
Sephadex G-100	0,5	4.377	8.754	36	0,11

<sup>a</sup> Concentração mínima de proteína ( $\mu\text{g/ml}$ ) capaz de aglutinar uma suspensão de eritrócitos tripsinizados de coelho (2%).

**Tabela 1.2 - Purificação da lectina da alga marinha vermelha *C. cupressoides* por Cromatografias de afinidade e de filtração em gel (BENEVIDES *et al*, 2001).**

Frações	Proteína Total (mg)	Atividade Hemaglutinante (unidades/mg)			CMA <sup>a</sup>
		Total (UH)	Específica	(%)	
Extrato Bruto	94,0	16.000	170	100	5,8
$\alpha$ - lactose agarose	3,5	6.016	1719	38	0,58
Bio Gel P-100	0,2	960	4800	6	0,21

<sup>a</sup> Concentração mínima de proteína ( $\mu\text{g/ml}$ ) capaz de aglutinar uma suspensão de eritrócitos tripsinizados de coelho (2%).

## 5.2. Ensaio biológicos da LCc

Após a sua obtenção por procedimentos de purificação, a LCc foi utilizada nos ensaios biológicos.

O efeito antinociceptivo da LCc foi investigado através da utilização de modelos clássicos de testes nociceptivos, induzidos por estímulos químicos como o teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético e formalina, bem como por estímulo térmico, através do teste da placa quente. O efeito antiinflamatório foi avaliado pelo ensaio de migração de neutrófilos induzida por carragenina.

O ácido acético atua indiretamente por induzir a liberação de mediadores endógenos, tais como prostaglandinas  $E_2$  e  $F_{2\alpha}$  ( $PGE_2$  e  $PGF_{2\alpha}$ ) nos fluidos peritoneais assim como os produtos da lipoxigenase, que estimula os neurônios nociceptivos. Portanto, o resultado das contorções abdominais induzidas por ácido acético sugere que o mecanismo de antinocicepção pode ser ligado em parte por inibição da lipoxigenase e/ou da ciclooxigenase em tecidos periféricos, que por conseqüência, reduz a síntese de  $PGE_2$  e interferem no mecanismo de transdução nos nociceptores aferentes primários. (SULAIMAN *et al.*, 2008).

A LCc (3; 9 e 27 mg/kg) foi capaz de reduzir de forma significativa e dose-dependente o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,8%, quando comparados ao grupo controle, obtendo-se uma redução de 37,2%; 53,5% e 86,0%, respectivamente (Tabela 2, Figura 9).

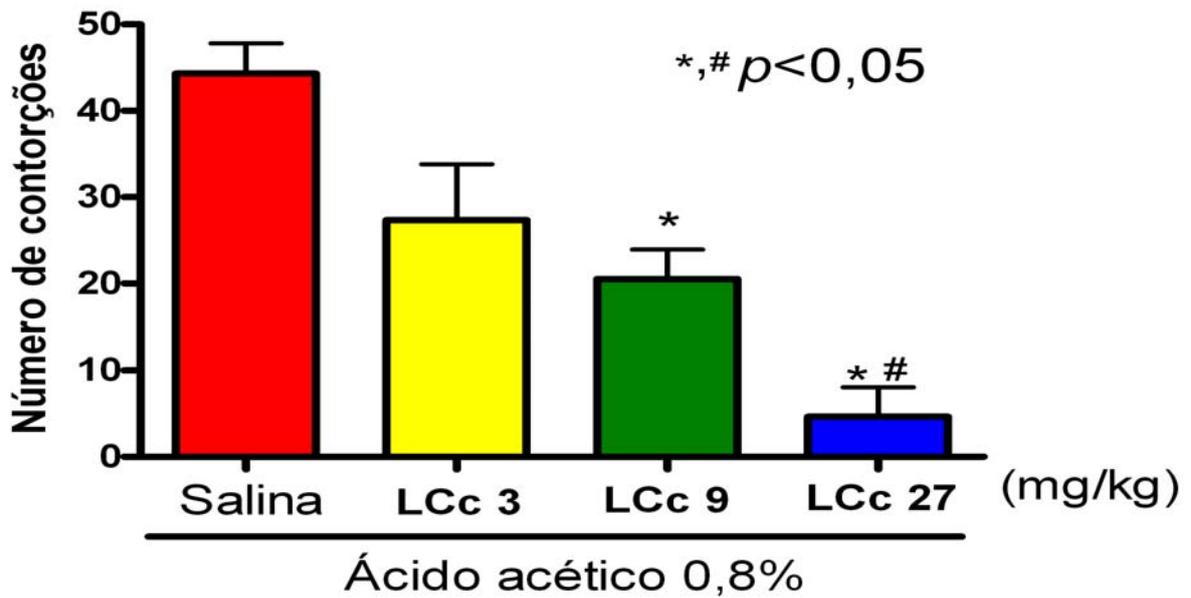
Para confirmar se o efeito antinociceptivo da LCc foi de fato decorrente da mesma, a lectina foi usada na presença de seu açúcar inibidor, mucina, para comprovar seu efeito antinociceptivo. Foi observado que a mucina, além de não interferir no número de contorções de forma significativa, também inibe a ação da LCc mesmo na sua maior dose (27 mg/kg). (Tabela 2, Figura 10).

A LCc na sua maior dose teve seu efeito também comparado ao agonista opióide morfina e ao AINE indometacina, sendo que a morfina praticamente aboliu o efeito nociceptivo, inibindo as contorções em 98,2%. A indometacina promoveu uma redução significativa de 55,7%, do número de contorções quando comparados ao grupo controle (Tabela 2, Figura 10).

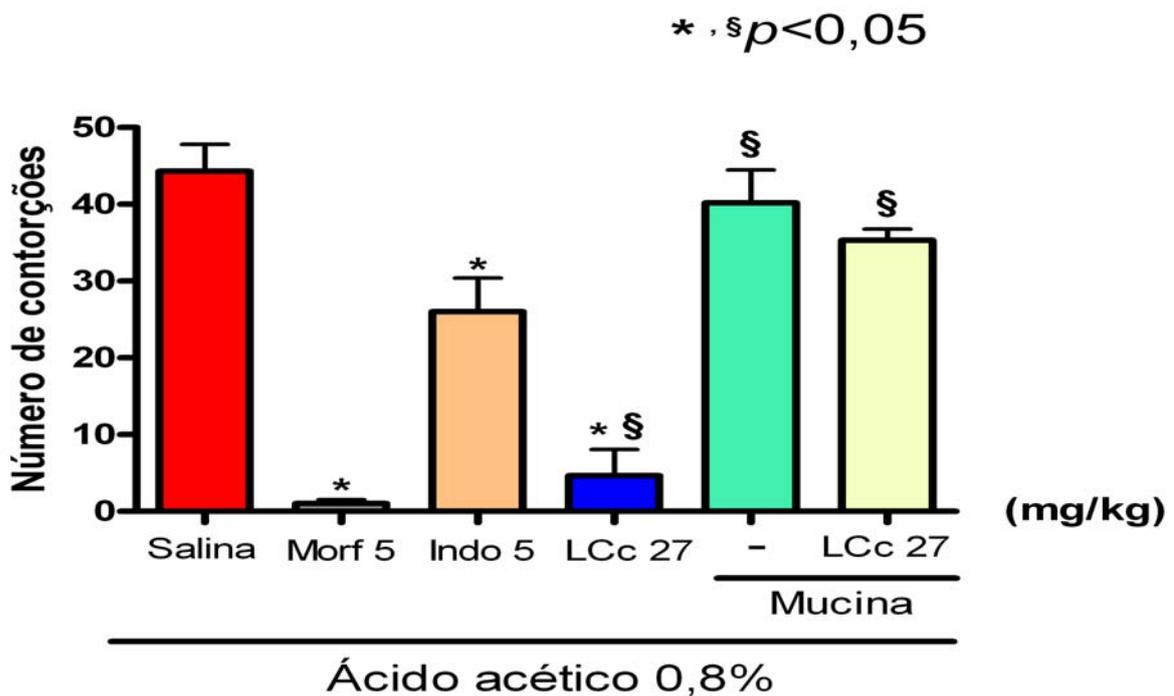
**Tabela 2 - Efeito antinociceptivo da lectina Cc na ausência e presença de seu açúcar inibidor (mucina) no teste de contorções abdominais em camundongos.**

SUBSTÂNCIAS	DOSE (mg/kg; via adm.)	MÉDIA do Nº de CONTORÇÕES	% de INIBIÇÃO
Controle (salina)	-	44,3 ± 3,4	-
Morfina	5; s.c.	0,8 ± 0,5 *	98,2
Indometacina	5; s.c.	19,6 ± 2,5	55,7
LCc	3; i.v.	27,7 ± 6,3	37,5
	9; i.v.	20,6 ± 3,6 *	53,5
	27; i.v.	7,1 ± 3,6 *, #, §	83,8
LCc + Mucina	27 + 2 mg/ml; i.v.	35,3 ± 1,4 <sup>§</sup>	20,3
Mucina	2 mg/ml; i.v.	40,1 ± 4,3 <sup>§</sup>	9,5

Os valores representam a média ± e.p.m. do número de contorções causadas pelo ácido acético (6/grupo). \* $p < 0,05$  comparando com o controle salina (NaCl 0,15M), #  $p < 0,05$  comparando entre as doses e §  $p < 0,05$  comparando a LCc com a glicoproteína mucina com e sem a LCc. (Anova; Teste de Bonferroni).



**Figura 9: Efeito da administração sistêmica da lectina *C. cupressoides* na resposta às contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.** O número de contorções foi determinado entre 0 e 30 min, após injeção i.p. de ácido acético 0,8% (v/v), 0,1ml/10g de peso de animal. *C.cupressoides* (3, 9 e 27 mg/kg; i.v.). Os dados são expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 6 animais por grupo. \* $p < 0,05$  comparando com o controle Salina (NaCl 0,15M), #  $p < 0,05$  comparando entre as doses de LCc (Anova; Bonferroni).



**Figura 10: Efeito da administração sistêmica da lectina *C.cupressoides* na resposta às contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos frente a controles positivos e negativos.** Foram aplicadas Morfina (5 mg/kg, s.c.), Indometacina (5 mg/kg, s.c), Mucina (2 mg/ml, i.v.), Mucina ligada a LCc (2 mg/ml + 27 mg/kg, i.v.) ou Salina (i.v.), aplicadas 30 min. antes do ácido acético. Os dados são expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 6 animais por cada grupo). \* $p < 0,05$  comparando com o controle salina (NaCl 0,15M) e § $p < 0,05$  comparando a LCc com a glicoproteína mucina com e sem a LCc. (Anova; Bonferroni)

Os resultados obtidos podem ser comparados com os encontrados pela aplicação da lectina obtida da alga marinha vermelha *Pterocladella capillacea* que inibiu de maneira significativa e dose-dependente as contorções abdominais em 29,9%; 39,3% e 51,9%, respectivamente. A mesma lectina, foi inativada por incubação com mucina, tendo sua ação antinociceptiva inibida. A mucina administrada sozinha nos animais também não modificou a resposta nociceptiva causada pelo ácido acético. (SILVA, 2008).

A atividade antinociceptiva do extrato da planta *Thymus pubescens* na dose de 400 mg/kg foi comparado ao da morfina (1 mg/kg) e mostrou uma atividade maior que o controle indometacina (5 mg/kg). Esses resultados podem apoiar a hipótese da participação da *T. pubescens* na inibição da síntese de prostaglandinas desde o mecanismo de contorções abdominais pelo ácido acético envolve o processo de liberação de metabólitos do ácido araquidônico via ciclooxigenase e biossíntese de prostaglandinas (MAHMOUDI, MORTEZA-SEMNANI, MOJRA, 2008).

Magaji *et al.* (2008), afirmou que o extrato metanólico da planta *Securinega virosa* reduziu de forma dose-dependente as contorções abdominais, sendo que a inibição mais significativa ( $p < 0,001$ ), foi provocada pela maior dose (25 mg/kg), melhor inclusive que o respectivo controle positivo.

Por outro lado, outros autores mostraram uma redução significativa das contorções abdominais na dose mais baixa, mas não na dose mais alta, isso pode ser devido à maior dose apresentar constituintes que enfraquecem ou agem contra os constituintes ativos que induzem a atividade antinociceptiva (GUZZO *et al.*, 2008).

Quando os animais receberam proteína associada ao seu ligante mucina, não foi possível observar diminuição das contorções de forma significativa. O uso do ligante mucina no ensaio foi necessário para verificar que esta glicoproteína não tem nenhum efeito no mecanismo de nocicepção, e ao ser incubada com a LCc, impediu que esta diminuísse o número de contorções. A mucina também inibiu a atividade antinociceptiva da lectina da alga marinha vermelha *Pterocladella capillacea* (SILVA, 2008).

A resposta à contorção abdominal induzida por ácido acético é largamente usada na detecção de atividade antinociceptiva de compostos, e o efeito nociceptivo gerado pelo ácido se deve pela liberação de citocinas, tais como interleucinas e do fator de necrose tumoral pelos macrófagos e mastócitos residentes na região peritoneal (GUZZO *et al.*, 2008).

Desta forma, o resultado obtido sugere que o efeito antinociceptivo da LCc possa estar relacionado à inibição da liberação de mediadores e pela inibição da migração de células que provocariam o processo doloroso.

Em seguida, para confirmar a ação antinociceptiva da LCc, foi realizado o teste da formalina, que apresenta 2 fases, sendo a primeira fase ou neurogênica, representada pelo painel A e a segunda fase ou inflamatória, pelo painel B (Figuras 11 e 12). A formalina a 1% aplicada na região intraplantar, causou um aumento significativo no tempo de lambertura da pata em ambas as fases. A LCc administrada nas doses de 3, 9 e 27 mg/kg foi capaz de inibir o tempo de lambertura em 28%; 30,8% e 45,3% na 1ª fase, sendo significativa apenas na maior dose e na 2ª fase do teste, ocorreu redução de 56,5%; 62,5% e 86,3%, respectivamente, sendo as doses de 9 e 27 mg/kg significantes e doses-dependentes quando comparadas ao grupo controle (Tabela 3; Figura 11).

Para confirmar se o efeito antinociceptivo da LCc, foi de fato decorrente da mesma, a lectina foi usada na presença de seu açúcar inibidor, mucina, para comprovar seu efeito antinociceptivo. Foi observado que a mucina, além de não interferir no resultado de forma significativa, também inibe a ação da LCc mesmo na sua maior dose (27 mg/kg).

A LCc em sua maior dose teve seu efeito também comparado ao agonista opióide morfina e ao AINE indometacina, sendo que a morfina novamente inibiu o efeito nociceptivo, em ambas as fases (91% e 92%, respectivamente) e a indometacina promoveu uma redução significativa em ambas as fases, de 49,6% e 63,2%, quando comparados ao grupo controle.

Na presença do antagonista opióide naloxona, a morfina teve sua ação inibida de forma praticamente completa, enquanto que a LCc teve sua ação parcialmente inibida. Assim, considerando esta inibição parcial, supõe-se que a LCc esteja atuando por mecanismo periférico (Tabela 3, Figura 12).

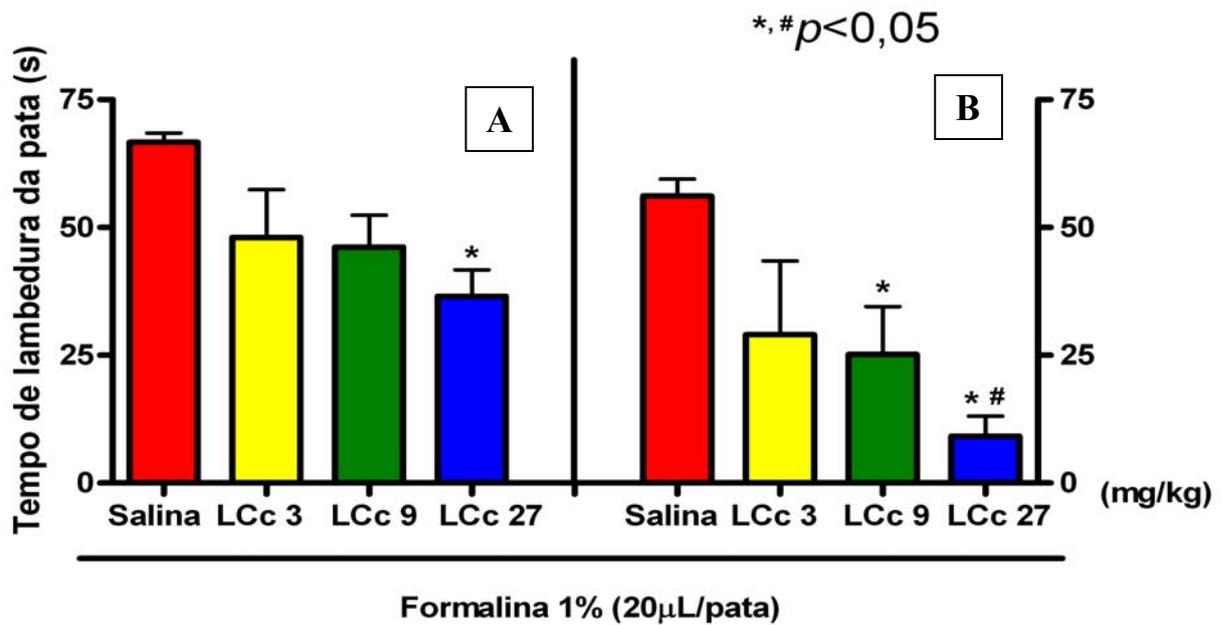
Tabela 3 - Efeito antinociceptivo da lectina Cc na ausência e presença de seu açúcar inibidor (mucina), no teste da formalina em camundongos.

SUBSTÂNCIAS	DOSE (mg/kg; via)	1ª FASE (0-5 min)	% de INIBIÇÃO	2ª FASE (20-25 min)	% de INIBIÇÃO
Controle (Salina)	-	66,7 ± 2,6	-	56,1 ± 3,3	-
Morfina	5; s.c.	5,3 ± 2,1*	92,0	5,6 ± 2,6*	91,6
Indometacina	5; s.c.	36,6 ± 5,0*	49,6	24,5 ± 5,6*	63,2
Morfina + Naloxona	5; s.c. + 2; i.p.	65,1 ± 4,7	2,3	45,8 ± 10,1	31,3
LCc + Naloxona	27; i.v. + 2; i.p.	46,0 ± 5,5	31,0	28,8 ± 9,0*	51,3
LCc	3; i.v.	48,0 ± 9,4	28,0	29,0 ± 14,5	56,5
	9; i.v.	46,1 ± 6,2	30,8	25,1 ± 9,3*	62,5
	27; i.v.	36,5 ± 5,2*	45,3	9,1 ± 3,9* <sup>#,§</sup>	86,3
LCc + Mucina	27; i.v. + 2mg/ml; i.v.	61,6 ± 7,9	7,6	54,0 ± 12,2 <sup>§</sup>	5,3
Mucina	2 mg/ml; i.v.	64,8 ± 5,4	2,8	53,1 ± 10,6 <sup>§</sup>	3,7

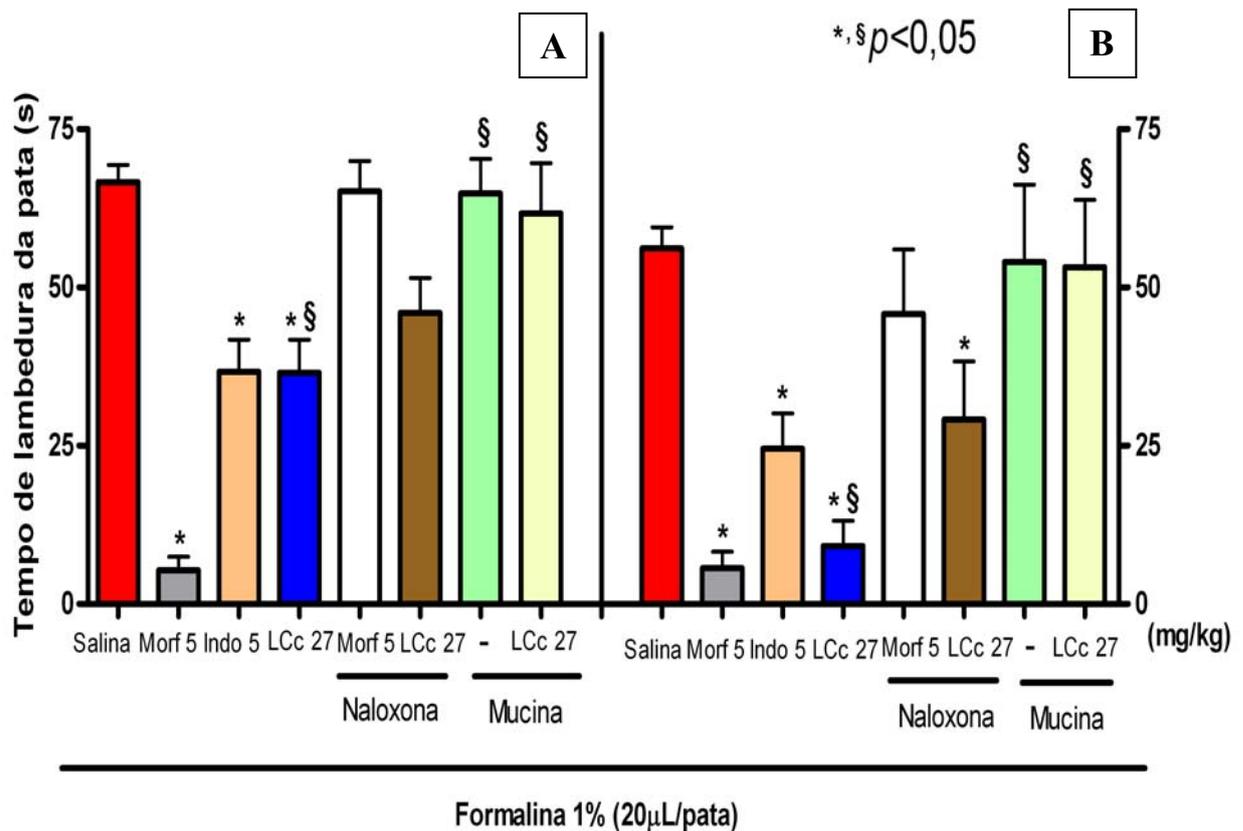
Os valores representam a média ± e.p.m. do tempo de lambertura em segundos em cada fase. (6/grupo).

\* $p < 0,05$  comparado com o controle salina (NaCl 0,15M), #  $p < 0,05$  comparando entre as doses e

§  $p < 0,05$  comparando a LCc com a glicoproteína mucina com e sem a LCc.



**Figura 11: Efeito da administração sistêmica da lectina *C.cupressoides* no teste da formalina em camundongos.** O tempo de lambedura foi determinado durante os 5 primeiros minutos (1ª fase – Painel A) e durante 20-25 min (2ª fase – Painel B) por injeção de formalina 1% em camundongos. Lectina *C.cupressoides* (3, 9 e 27 mg/kg; i.v) ou Salina (i.v), foram aplicadas 30 min. antes da formalina. Os dados são expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 6 animais por cada grupo. \* $p < 0,05$  indica diferença significativa para o grupo controle (salina). (Anova, Bonferroni).



**Figura 12: Efeito da administração sistêmica da lectina *C. cupressoides* no teste da formalina em camundongos frente a controles positivos e negativos.** Foram aplicadas Morfina (5 mg/kg; s.c), Indometacina (5 mg/kg; s.c), LCc (27 mg/kg), Morfina (5 mg/kg, s.c) ou LCc (27 mg/kg) com Naloxona (2 mg/kg), Mucina (2 mg/ml; i.v), Mucina ligada a LCc (2 mg/ml +27 mg/kg; i.v.) ou Salina (i.v), aplicadas 30 min. antes da formalina. Os dados são expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 6 animais por cada grupo. \* $p < 0,05$  indica diferença significativa para o grupo controle (Salina). (Anova, Bonferroni).

Os resultados obtidos estão de acordo com outros autores que mostraram que os fármacos que atuam primariamente como analgésicas de ação central, como a morfina, inibem ambas as fases (SULAIMAN *et al.*, 2008) e, por outro lado, os que atuam periféricamente, como o antiinflamatório não esteroide aspirina, inibe apenas a segunda fase do teste da formalina (RIDTITID *et al.*, 2008).

Da mesma forma, a lectina foi novamente inativada por incubação com mucina e teve sua ação antinociceptiva inibida em ambas as fases, de acordo com estudos anteriores (SILVA, 2008).

Lee e Choi (2008) encontraram efeito significativo nas duas fases do teste e concluiu que o extrato da planta *Ligularia fischeri* contém um princípio analgésico ativo atuando tanto central quanto periféricamente. Ainda, foi observado noutro estudo que o pré-tratamento com o antagonista opióide naloxona reverteu significativamente o efeito do extrato da folha de *Ficus deltoidea* e da morfina em ambas as fases, da mesma forma, prolongou o estímulo térmico na placa quente. Esses resultados sugeriram que receptores opióides centrais estejam envolvidos na ação antinociceptiva do extrato da *Ficus deltoidea* (SULAIMAN *et al.*, 2008).

Uma vez que a LCc inibiu a resposta nociceptiva em ambas as fases, nas três concentrações testadas, porém mais intensamente na segunda fase e sua ação não foi totalmente revertida por naloxona, buscou-se comprovar sua ação central ou periférica no teste da placa quente, que é um teste específico de ação central no qual agentes opióides exercem seus efeitos analgésicos via receptores espinhais e supra-espinhais (NEMIROVSKY *et al.*, 2001).

O resultado mostrou que a LCc (27 mg/kg) não promoveu aumento significativo do tempo médio de reação dos camundongos ao estímulo térmico, quando comparado ao grupo controle morfina (5 mg/kg). Porém quando comparado ao grupo salina, a LCc apresentou um superior tempo de reação à placa quente. O controle indometacina (5 mg/kg) apresentou resultado mais próximo do grupo controle em relação à LCc, e não apresentou aumento no tempo de reação ao estímulo térmico. Esse modelo sugere que a LCc atuou por mecanismo periférico, embora não esteja descartado totalmente uma possível atuação central (Figura 13, Tabela 4).

Lee e Choi (2008) mostrou que animais tratados com a folha de *Ligularia fischeri*, nas doses de 100 e 200 mg/kg apresentaram um período de latência mais longo que o grupo controle. O resultado sugeriu que a *Ligularia fischeri* teria um efeito central.

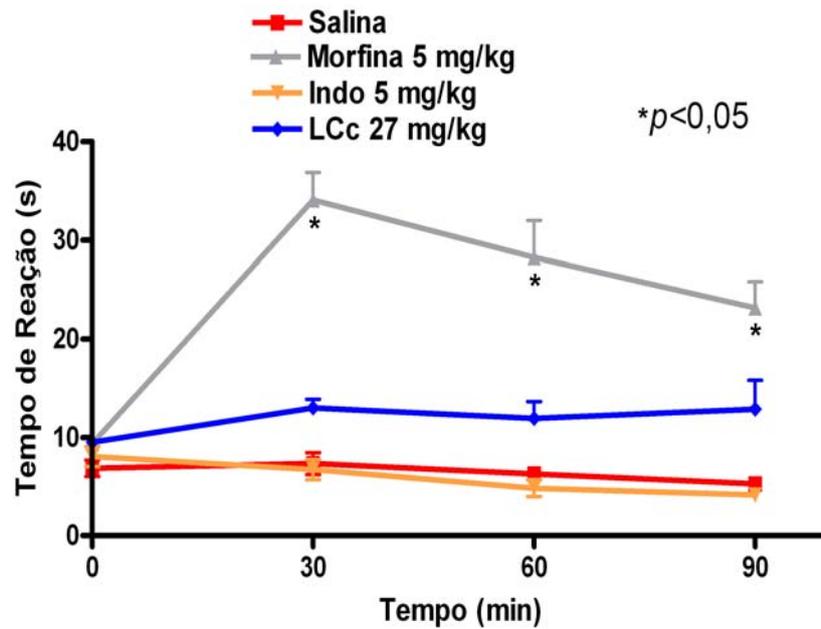
Silva (2008) mostrou também que a morfina causou um aumento significativo na latência para camundongos lamberem a pata ou saltar, quando comparados ao grupo controle.

Por outro lado, a lectina *Pterocladella capillacea* não alterou significativamente as latências, em comparação com os controles salina ou indometacina. A mesma tendência foi observada para os valores a 30, 60 e 90 min após a administração dessa lectina. Estes dados apóiam fortemente a exclusão do sistema nervoso central, como locais relevantes da sua ação.

**Tabela 4 - Efeito da LCc no teste da placa quente em camundongos.**

GRUPO	DOSE (mg/kg; via)	TEMPO DE REAÇÃO (s)			
Controle (Salina)	-	6,8±0,8	7,3±1,1	6,2±0,6	5,3±0,4
Morfina	5; s.c.	10,2±0,7	34,1±2,8*	29,8±1,4*	23,1±2,7*
Indometacina	5; s.c.	8,1±1,0	6,7±1,0	4,8±0,8	4,1±0,6
LCc	27; i.v.	9,5±0,6	13±0,9	11,9±1,7	12,8±2,9

Os valores representam a média ± e.p.m. do tempo de reação em (s). \* $p < 0,05$  comparado com o controle Salina (NaCl 0,15 M) (Anova, Bonferroni).



**Figura 13:** Efeito da administração sistêmica da lectina *C. cupressoides*, morfina ou indometacina durante o tempo de reação ao estímulo térmico (Placa Quente) induzido em camundongos. Os animais receberam s.c. Morfina (5 mg/kg) ou Indometacina (5 mg/kg) e receberam i.v. Salina e LCc (27 mg/kg). O tempo de reação foi mensurado após a injeção de drogas (tempo controle) e 30, 60 e 90 min após a aplicação. Os dados são expressos como média  $\pm$  e.p.m. de 6 animais por cada grupo. \* $p < 0,05$  indica diferença significativa para o grupo controle (Salina). (Anova, Bonferroni).

Após a LCc apresentar atividade antinociceptiva significativa, foi observada também sua ação antiinflamatória através do ensaio de migração de neutrófilos induzida por carragenina.

A Carragenina (Cg) é um polissacarídeo bastante usado para induzir resposta inflamatória aguda em animais, uma vez que induz a liberação de vários mediadores inflamatórios, como a histamina, a bradicinina, a prostaglandina, e ânions superóxidos (DI ROSA, 1972). A carragenina injetada na cavidade intraperitoneal causa peritonite.

O modelo de peritonite é bem caracterizado num modelo experimental de inflamação aguda que permite a quantificação e correlação de migração de células juntas com vários mediadores inflamatórios. (MONTANHER *et al.*, 2007).

Nesses modelos de inflamação induzido por carragenina, a inflamação pode ser bloqueada por um pré-tratamento com drogas antiinflamatórias não-esteroidais ou por inibidores seletivos da COX-2, tais como a Dexametasona (Dexa).

A LCc reduziu ( $p < 0,05$ ) a migração de leucócitos totais (Figura 14A), devido o decréscimo de neutrófilos após a quarta hora em 65,9%, em relação ao controle Cg, semelhantemente ao efeito da Dexa, que reduziu a migração neutrofilica em 61,9%. O controle Salina não induziu migração de neutrófilos, apresentando-se com 63,4% de neutrófilos a menos do grupo Cg. (Figura 14B).

Os resultados podem ser comparados aos de Montanher *et al.* (2007), que avaliaram o efeito da planta *Passiflora edulis* (250 mg/kg; i.p.), administrada meia hora antes da carragenina e no final, reduziu significativamente o influxo de leucócitos (porcentagem de inibição:  $67 \pm 10\%$ ) devido ao decréscimo de neutrófilos (porcentagem de inibição:  $85 \pm 5\%$ ), redução semelhante foi também observada com a Dexametasona, considerado uma importante droga anti-inflamatória (porcentagem de inibição:  $72 \pm 5\%$ ).

A lectina da semente de *Araucaria angustifolia* nas doses de 0,1 e 1 mg/kg, injetada i.v. antes do estímulo inflamatório induzido por carragenina reduziu a migração de neutrófilos em 69 e 92%, respectivamente (SANTI-GADELHA *et al.*, 2006).

O pré-tratamento com a lectina da planta *Lonchocarpus sericeus* (3 ou 10 mg/kg; i.v.) diminuiu de forma dose-dependente ( $p < 0,005$ ) a migração de neutrófilos em camundongos, induzidas por injeção i.p. de carragenina (500  $\mu\text{g}/0.2 \text{ mL}$ ) determinada 4 horas depois (NAPIMOGA *et al.*, 2007).

A fração 1 (água/metanol, de razão 9:1) obtida do extrato aquoso da planta *Dasyphyllum brasiliensis* apresentou redução significativa no número de neutrófilos (52%) quando comparado ao controle. Os animais tratados com a fração 2 (água) apresentaram uma

redução do recrutamento de eosinófilos (49%) e células mononucleares (43%). Por outro lado, animais tratados com a fração 3 (água/metanol, na razão 1:1) reduziram apenas o recrutamento de neutrófilos (57%) quando comparado ao grupo controle. A Dexametasona, usada como controle positivo, inibiu o recrutamento de neutrófilos, eosinófilos e monócitos significativamente (CASTELUCCI *et al.*, 2007).

Sugere-se que neste modelo a LCc foi capaz de reduzir a migração de neutrófilos, o que a torna uma ferramenta interessante para novos estudos de inflamação.

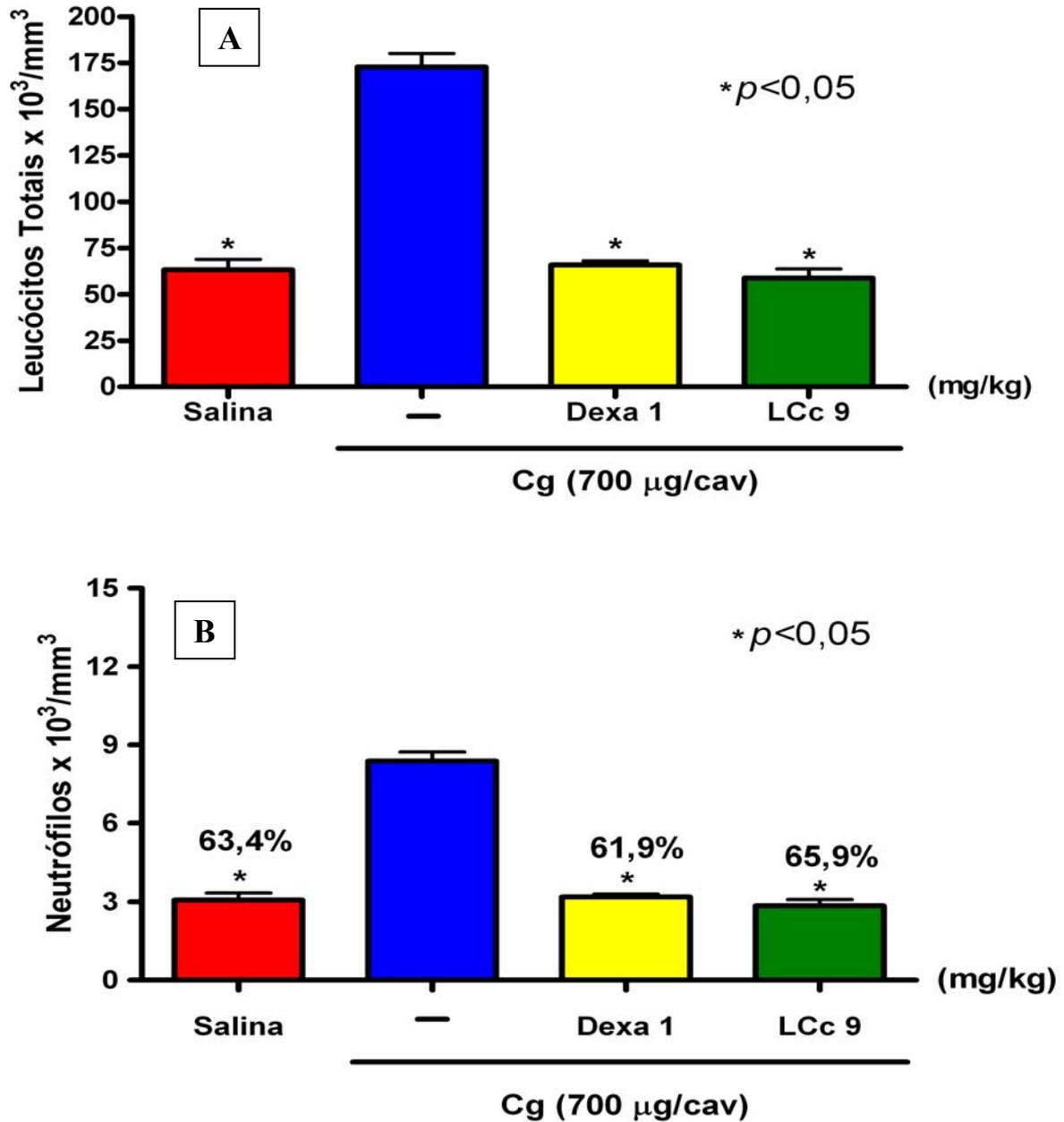


Figura 14: Efeito da lectina *C. cupressoides* no modelo de peritonite induzida por carragenina no número total de leucócitos (A) ou no número de neutrófilos (B). Os dados são expressos como média ± e.p.m. de 5 animais por grupo. \* $p < 0,05$  indica diferença significativa para o grupo que recebeu apenas carragenina (-) (Anova, Bonferroni).

### 5.3. Avaliação Parcial da Toxicidade aguda

Após a realização dos testes de atividade antinociceptiva e antiinflamatória, foram avaliados alguns parâmetros da toxicidade por dose repetida da LCc na dose de 9 mg/kg; i.v. Durante um período de 7 dias consecutivos, não houve mortalidade entre os animais, e os mesmos não apresentaram alterações físicas ou comportamentais.

Toxicidade aguda é definida como os efeitos adversos que ocorrem dentro de um período curto após a administração de uma dose única ou doses múltiplas (OGA, 2003). É importante avaliar não apenas a quantidade de animais mortos, mas também o início, a natureza e a duração da intoxicação associada à morte (OGA, 2003).

Após o sacrifício e retirada dos órgãos, não foram observadas alterações significantes na massa corporal e nem no peso dos órgãos dos animais por parte da LCc, quando comparados aos seus respectivos controles (Tabela 5, Figuras 15 e 16).

Antes do sacrifício, os animais tiveram seu sangue coletado para a verificação de alterações enzimáticas importantes presentes no plasma sanguíneo. Observou-se através das análises bioquímicas obtidas pelas dosagens de enzimas (Tabela 6), que a LCc não alterou de forma significativa as concentrações de Uréia, mostrando que ela não provocou possíveis alterações renais (Figura 17). Os resultados obtidos pelas dosagens das transaminases glutâmico oxaloacética e glutâmico pirúvica, mostraram ausência de alterações hepáticas, uma vez que não houve diferença estatística entre o grupo controle Salina e a LCc. (Figura 18).

Esses parâmetros de toxicidade foram também usados em compostos organoselênicos, como difenil diselenida, que, por não terem afetado o ganho de peso corporal de animais e de não terem causado evidentes sinais de lesões hepáticas como indicado pelas atividades de plasma das enzimas TGO e TGP, ou renais pelas dosagens de Uréia, conclui-se que realmente a administração crônica de ebselen a 1 mg/kg não causou sinais de toxicidade nos animais (BARBOSA *et al.*, 2006).

Assim sendo, em nenhum desses parâmetros analisados, a LCc provocou alterações significantes neste grupo de animais, comprovando que a lectina ao ser administrada ao longo dos dias de experimento, revelou-se tolerável, mostrando-se viável até a dose testada como um possível composto antinociceptivo ou antiinflamatório a nível sistêmico, porém para uma análise mais apurada da toxicidade aguda, seriam necessários outros estudos posteriores, tais como: análise histopatológica, de teratogenicidade, entre outros.

Tabela 5. Correlação órgão/massa corpórea entre o grupo controle e a LCc

<b>ANIMAIS</b>	<b>ÓRGÃO</b>	<b>MÉDIA ± E.P.M.</b>
Salina	Fígado	5,23±0,195
	Rim	0,840±0,015
	Coração	0,568±0,055
LCc 9 mg/kg	Fígado	6,02±0,100
	Rim	0,851±0,065
	Coração	0,639± 0,039

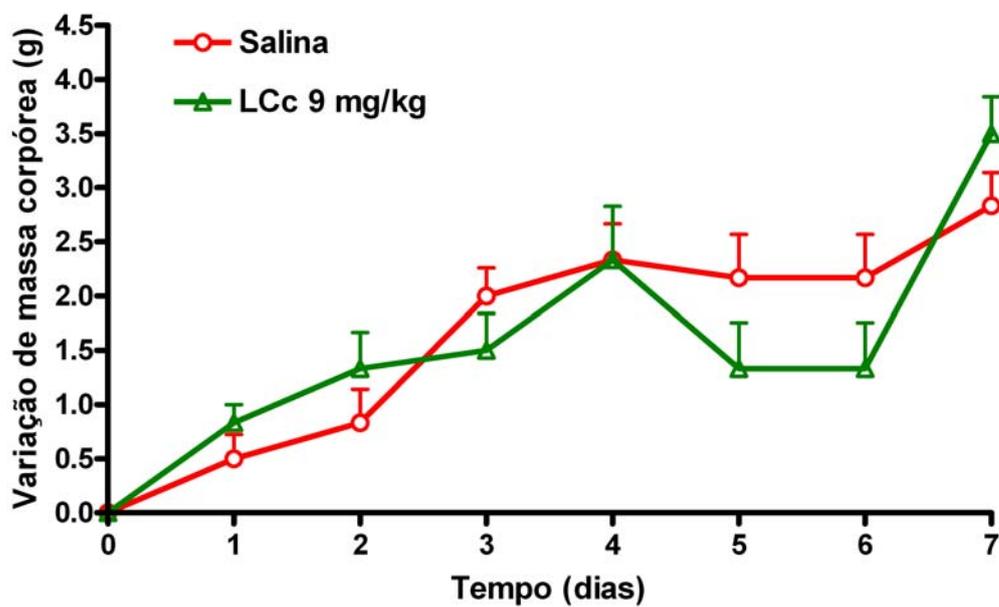


Figura 15: Variação da relação de peso dos animais durante o período de sete dias como parâmetro de toxicidade da LCc. As barras representam a média  $\pm$  e.p.m. (Anova, Bonferroni).

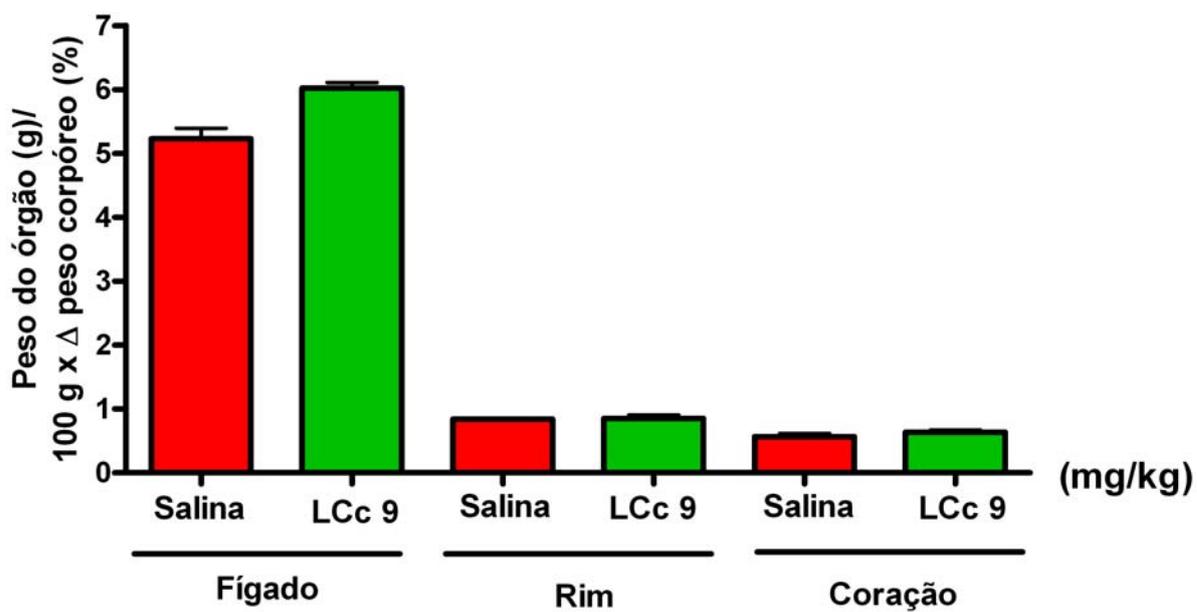
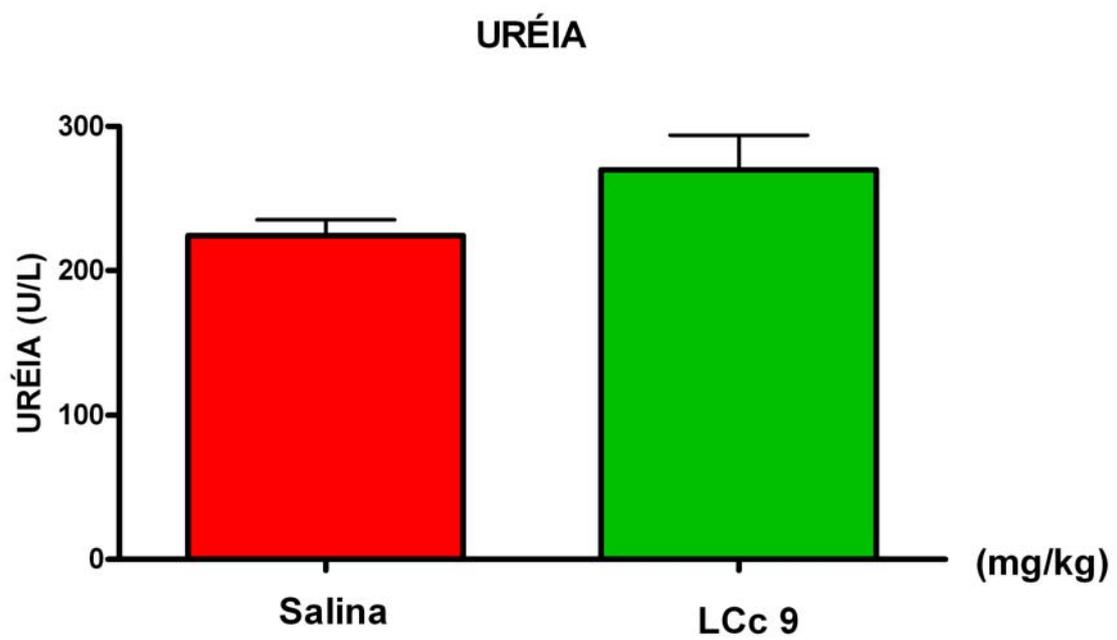


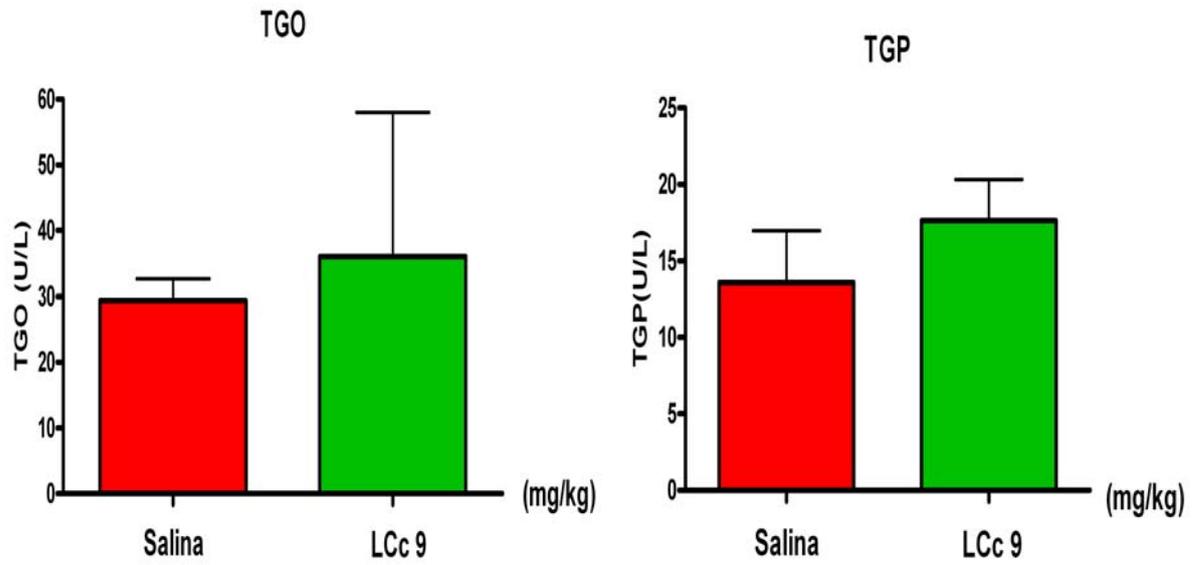
Figura 16: Variação do peso dos órgãos (fígado, rim e coração) em camundongos ao longo de sete dias como parâmetro de toxicidade da LCc. As barras representam a média  $\pm$  e.p.m. (Anova, Bonferroni)

Tabela 6. Dosagens séricas da Uréia e das Transaminases Glutâmico Oxaloacética (TGO), Glutâmico Pirúvica (TGP).

<b>DOSAGEM SÉRICA</b>	<b>ANIMAIS</b>	<b>MÉDIA ± E.P.M.</b>
Uréia	Salina	224,3±10,84
	LCc 9 mg/kg	270,0±24,00
TGO	Salina	29,44±3,193
	LCc 9 mg/kg	36,00±21,98
TGP	Salina	13,59±3,373
	LCc 9 mg/kg	17,64±2,676



**Figura 17: Dosagem bioquímica de Uréia, representando a sua quantidade por U/L. As barras representam a média  $\pm$  e.p.m. (Anova, Bonferroni).**



**Figura 18: Dosagem bioquímica da TGO e TGP, representando a sua quantidade por U/L. As barras representam a média  $\pm$  e.p.m. (Anova, Bonferroni).**

## 6. CONCLUSÃO

A obtenção da lectina *Caulerpa cupressoides* por métodos cromatográficos de troca iônica e afinidade mostrou-se eficiente.

A lectina *Caulerpa cupressoides* utilizada nos modelos de nocicepção mostrou atividade antinociceptiva periférica sem ação central importante.

Os dados mostraram que a lectina *Caulerpa cupressoides* pode atuar também no mecanismo de dor inflamatória, já que se mostrou eficaz no ensaio de migração de neutrófilos.

A lectina *Caulerpa cupressoides* mostrou-se relativamente segura após a avaliação de parâmetros de toxicidade aguda por dose repetida.

## 7. REFERÊNCIAS

AGRAW, B.B.L. & GOLDSTEIN, I.J. Specific binding of Concanavalin A to cross-linked dextran gels. **The Biochemical Journal**, v.96, p. 23-25, 1965.

AINOUZ, I.L. *et al.* Agglutination of enzyme treated erythrocytes by Brazilian marine algae. **Botanica marina**, v.35, n.11, p. 475-479, 1992.

AINOUZ, I.L. *et al.* Comparative study on haemagglutinins from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.7, n.1, p.15-19, 1995.

ANDRADE, M.C.H. **Estudos farmacológicos em algas marinhas: aplicação da lectinas de *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kütz. and *B. triquetrum* (S.G.Gmel.) M. Howe como drogas analgésicas**, 1999, 97p. Dissertação (Mestrado) em Bioquímica - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.

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

BARBOSA, N.B.V. *et al.* Diphenyl diselenide reduces temporarily hyperglycemia: Possible relationship with oxidative stress. **Chemico-Biological Interactions**, v.163,p. 230-238, 2006

BENEVIDES, N.M.B. ; LEITE, A. M.; FREITAS, A. L. P. Atividade hemaglutinante na alga vermelha *Solieria filiformis*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.8, n.2, p.117-122, 1996.

BENEVIDES, N.M.B. *et al.* Proximate analysis, toxic and antiutritional factors of ten brazilian marine algae. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.10, n.1, p.31-36, 1998a.

BENEVIDES, N.M.B. *et al.* Purification and partial characterization of the lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh. **Botanica Marina**, v.44, p.17-22, 2001.

BEVILACQUA, M. P. *et al.* Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease. **Annu. Rev. Med.**,v. 45, p. 361- 378, 1994.

BITENCOURT, F.S. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea cervicornis*, **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.**, v.377, p.139-148, 2008.

BONINA, F. Note: 1-ethylazacycloalkan-2-one indomethacin esters as new oral prodrugs: chemical stability, enzymatic hydrolysis, anti-inflammatory activity and gastrointestinal toxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v.156, p.245-250, 1997.

BOYD, W.C.; ALMODOVAR, L.R. & BOYD, L.G. Agglutinin in marine algae for human erythrocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.6, p. 82-83, 1966.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v.722, p. 248-254, 1976.

BRAGGIO, M. M. *et al.* Atividades farmacológicas das folhas de *Sesbania virgata* (CAV.) Pers. **Arquivo do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 69, n. 4, p. 49-53, 2002.

CARDOZO, K.H. *et al.*, Metabolites from algae with economical impact. **Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol Pharmacol.**, v.146 p. 60-78, 2007.

CASTELUCCI, S. *et al.* Anti-inflammatory activity of *Dasyphyllum brasiliensis* (Asteraceae) on acute peritonitis induced by  $\beta$ -glucan from *Histoplasma capsulatum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, p. 192–198, 2007.

COSTA, F.H.F. *et al.* Purification and characterization of a lectin from the red marine alga *Amansia multifida*. **Physiology Molecular Biology Plants**, v.5, p.53-61, 1999.

COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. **Robbins: Patologia Estrutural e Funcional**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, p. 168-176, 2000.

DI ROSA, M. Pharmacological properties of carrageenan. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 24, p. 89-102, 1972.

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

FREITAS, A. L. P. *et al.* A new survey of Brazilian marine algae for agglutinins. **Journal of applied Phycology**, v. 9, p. 495-501, 1997.

FUCHS, F. D. E., WANNAMACHER, L. em: **Farmacologia Clínica: Fundamentos da Terapêutica Racional**. 2ª Ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1998.

GUYTON, A. C., HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Editora Guanabara Koogan, 10ª ed. São Paulo, 973pp, 2002.

GUZZO, L.S. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activities of ethanolic extracts of *Lychnophora* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v.116, p.120–124, 2008.

HAMPTON, M. B., KETTLE, A. J., WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v. 92, n.9, p. 3007-3017, 1998.

HOLANDA, M.L. *et al.* Differential activity of a lectin from *Solieria filiformis* against human pathogenic bacteria. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38: 1769-1773, 2005.

HORI, K.; MIYAZAWA, K.; ITO, K. Some common properties of lectins from marine algae. **Hydrobiologia**, v.204/205, p.561-566, 1990.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neurosciences Methods**, v.14, p.69-79, 1985.

IKEDA, Y *et al.* Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sci**, v. 69, p. 2911-2919, 2001.

JOLY, A.B. **Flora marinha do litoral norte do Estado de São Paulo e regiões circunvizinhas**, 1965, 406 pp. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1965.

JUNQUEIRA, L.C.U. ; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10 ed. Guanabara Koogan, 2004, 540p.

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

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4, **Nature**, v.227, p. 680-685, 1970.

LEE, K. H.; CHOI, E. M. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Ligularia fischeri* leaves in experimental animals. **J. Ethnopharmacol** doi:10.1016/j.jep.2008.07.038, 2008.

LEE, R.E. Phycology. **2th Ed. Cambridge University Press**, New York, N.Y. 10011-4211, USA, 1997.

LEITE, Y.F. *et al.* Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effects on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica and Biophysica Acta (BBA)**, v.1724, p.137-145, 2005.

LIS, H. & SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v.98, p.637-674, 1998.

MAGAJI, M.G *et al.* Preliminary studies on anti-inflammatory and analgesic activities of *Securinega virosa* (Euphorbiaceae) in experimental animal models. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.2, n.2, p.39-44, 2008.

MAHMOUDI, M.; MORTEZA-SEMNANI, K.; MOJRA, E. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of *Thymus pubescens* extract. **Fitoterapia** v.79, p. 361–365, 2008.

MONTANHER, A.B. *et al.* Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p.281-288, 2007.

MOREIRA, R. A. Desenvolvimento de um novo metodo para o isolamento de lectinas ligantes de galactose, pro cromatografia de afinidade. In: VI Reunião Regional da SBBq, 2002, Fortaleza. **Anais da VI Reunião Regional da SBBq**. p. 1-9, 2002.

NAPIMOGA, M.H. *et al.* *Lonchocarpus sericeus* lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokine and chemokines production. **International Immunopharmacology**, v.7, p. 824–835, 2007.

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

NEMIROVSKY, A. *et al.* The antinociceptive effect of the combination of spinal morphine with systemic morphine or buprenorphine, **Anesth. Analg.**, v. 93, p. 197-203, 2001.

NEVES, S.A. **Lectina de *Amansia multifida* Lamouroux: Especificidade fina por açúcares e ação farmacológica**, 2005, 154p. Tese (Doutorado) em Bioquímica - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

NEVES, S.A. **Lectina de *Gracilaria caudata*: Isolamento e caracterização parcial e estudo comparativo do seu efeito indutor de migração de neutrófilos *in vivo* e *in vitro*, com o de outras lectinas de algas marinhas**. 1999, 94p. Dissertação (Mestrado) em Bioquímica - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999.

NEVES, S.A. *et al.* Antinociceptive properties in mice of a lectin isolated from the marine alga *Amansia multifida* Lamouroux, **Bras. J. Med. Biol. Res.** v.40, p.127-134, 2007.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicidade**. Editora Atheneu, 2 ed., São Paulo, 474p, 2003.

OGAWA, S. *et al.* Histamine responses of large neostriatal interneurons in histamine H1 and H2 receptor knock-out mice. **Brain Research Bulletin**, v.78, p.189–194, 2009

OLIVEIRA, S.R.M. *et al.* Purification and characterisation of a lectin from the red marine alga *Pterocladia capilacea* Santel & Hommers. **Revista Brasileira de Botânica**, v.25, n.4, p.397-403, 2002.

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

PICOLO, G., GIORGI, R., CURY, Y.  $\delta$ - Opioid receptor nitric oxide mediate the analgesic effect of *Crotalus durissus* terrificus snake venom. **European Journal Pharmac.**, v. 391, p. 55 - 62, 2000.

POTAPOV, I. M. Izv. Akad Nank Kazah S.S.R. **Ser. Fizial. Med. Soviet Union**, v.5, n.712, p.1972, 1968.

RAFFIN, R.P. *et al.* Nanocápsulas Poliméricas Secas Contendo Indometacina: Estudo de Formulação e de Tolerância Gastrointestinal em Ratos. **Acta Farm. Bonaerense** **22**, v.2, p.163-172, 2003.

RANG, H. P. *et al.* **Farmacologia**, 6<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 920 p, 2007.

RATNER, B. D., BRYANT, S. J. Biomaterials: where we have been and where we are going. **Annual Review of Biomedical Engineering**, 6: 41-75, 2004.

RAVEN P.H.; EVERT, R.F.; EICHHOM, S.E. **Biology of plants**. 5 ed., Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan. 735 pp., 1996.

RAVEN P.H., EVERT, R. F. & EICHHOM, S. E. **Biologia vegetal**. 6ed., Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 906 pp., 2001.

RIDTITID, W. *et al.* Antinociceptive activity of the methanolic extract of *Kaempferia galangal* Linn. in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, 118, 225–230, 2008.

ROBBINS, S. L., COTRAN, R. S., KUMAR, V. **Pathologic basic of diseases**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1400p., 1994.

ROGERS, D.J.; BLUNDEN, B. & EVANS, P. R. *Ptilota plumosa*, a new source of a blood-group B specific lectin. **Medical Laboratory Sciences**, v.34, p.193-200, 1977.

ROGERS, D.J.; HORI, K. Marine algal lectins: new developments. **Hydrobiologia**, v.260/261, p.589-593, 1993.

ROGERS, D.J. *et al.* Binding of N-acetyl-D-galactosamine by lectins from species of green marine alga genus, *Codium*. In: "Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry". Van Driessche, E.; Fisher, J.; **Beeckmans, S. & Bog-Hansen, T.DC. Ed. 10**, p.162-165, 1994.

SANTI-GADELHA, T. *et al.* Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v.350, p.1050–1055, 2006.

SAMPAIO, A.H. Hemaglutininas de Algas Marinhas - Revisão. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 5, n. 2, p. 171-177, 1997.

- SAMPAIO, A.H.; ROGERS D.J.; BARWELL, C.J.. Isolation and characterization of the lectin from the green marine alga *Ulva lactuca* L. **Botanica Marina**. v. 41, p. 427-433, 1998.
- SELL, A.M.; COSTA, C.P. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. **Acta Scientiarum**. v. 22, n.2, p. 297-303, 2000.
- SILVA, N. S. F., SAKATA, R. K., ISSY, A. M. Effects of different spinal morphine doses in rats. **Rev. Bras. Anesthesiol**, v.54, n.1, p.60-67, 2004.
- SILVA, L.M.C.M. **Atividade antinociceptiva e antiinflamatória da lectina da alga marinha vermelha *Pterocladia capillacea* (S.G. Gmelin) Santelices & Hommersand**. 2008, 80p. Dissertação (Mestrado) em Bioquímica -Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.
- 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.
- STEPHANO, J.L.; GOULD, M.; ROJAS-GALICIA, L. Advantages of picrate fixation for staining polypeptides in polyacrylamide gels, **Analytical Biochemistry**, v.152, p.308-313, 1986.
- STITES, D. P., TERR, A. J. **Imunologia Básica**. Tradução José Mauro Peralta, Lúcia Martins Teixeira, Alexandre Januário da Silva. Rio de Janeiro: Editora Prentice-Hall do Brasil LTDA, p.102-117, 1992.
- SULAIMAN, M.R. *et al.* Evaluation of the antinociceptive activity of *Ficus deltoidea* aqueous extract. **Fitoterapia**, 5 pp., 2008.
- SZE, P. Introduction to algal characteristics and diversity. **A Biology of the Algae**. New York: Ed. McGraw-Hill Science/Engineering. 3ed, 288pp, 1997.
- VAN DAMME, E.J.M. *et al.* **Handbook of Plant lectin: Properties and Biochemical applications**. John Willey and Son, Chichester, UK, 452 pp., 1998.
- VERMA, P.R. *et al.* Antinociceptive activity of alcoholic extract of *Hemidesmus indicus* R.Br. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.102, p. 298-301, 2005.

VIANA, G.S.B. *et al.* Antinociceptive activity of sulfated carbohydrates from the red algae *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kütz. and *B. triquetrum* (S.G.Gmel.) M. Howe. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 713-722, 2002.

VIEIRA, L.A.P. *et al.* **Efeito analgésico periférico e central da lectina de *Bryothamnion seaforthii* kütz**, Caxambu, Minas Gerais: XIV Anual Meeting of the Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 1999.

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

ZIÓŁKOWSKA, N.E.; WLODAWER, A. Structural studies of algal lectins with anti-HIV activity, **Acta Bioch. Polon.**, v.53, p.617-626, 2006.