



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

**USO DAS LECTINAS DE ALGAS MARINHAS NO DIAGNÓSTICO DE DIABETES
MELLITUS E EM ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTIEDEMATOGÊNICA**

MARIA LUIZETE ALVES DA ROCHA

FORTALEZA

2006

**USO DAS LECTINAS DE ALGAS MARINHAS NO DIAGNÓSTICO DE DIABETES
MELLITUS E EM ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTIEDEMATOGÊNICA**

MARIA LUIZIETE ALVES DA ROCHA

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA

2006

Esta tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

María Luiziete Alves da Rocha

TESE APROVADA EM 23/02/2006

Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas
Orientadora
Universidade Federal do Ceará

Dr. Renan Magalhães Montenegro Júnior
Universidade de Fortaleza

Dra. Gláuce Socorro de Barros Viana
Universidade Federal do Ceará

Dra. Norma Maria Barros Benevides
Universidade Federal do Ceará

Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira
Universidade de Fortaleza

**“O valor das coisas não está no tempo que elas duram,
mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem
momentos inesquecíveis. Coisas inexplicáveis e pessoas
incomparáveis”.**

Fernando Pessoa

DEDICATÓRIA

A Ti meu DEUS, por não me abandonar nunca, principalmente nos momentos mais difíceis. Nesta etapa da vida, o Senhor me ensinou ainda mais o quanto devo aproveitar com sabedoria as pessoas que tanto amo.

Aos meus pais, Luiz Almeida da Rocha e Margarida Salete Alves da Rocha, agradecimento é pouco, pelo amor, apoio, incentivo e sobretudo pelo que eu sou hoje.

À minha irmã Luciana Alves da Rocha pelo carinho e amizade, apesar de considerá-la como uma filha, é meu exemplo de garra, determinação, e amor pelo estudo.

Ao meu esposo, Aldisney Campelo Coelho, meu muito obrigada por estar ao meu lado em todas minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS pela possibilidade de concluir este trabalho, por iluminar meu caminho, por dar-me saúde e principalmente pela vida.

À Profa. Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas pela dedicação, respeito e amizade em todos os anos em que convivemos juntas, desde a iniciação científica até o doutorado, sempre disposta a dar condições para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Renan Magalhães Júnior pela sua disponibilidade na coleta de sangue dos pacientes no HUWC, pelo incentivo no desenvolvimento do trabalho, pelos seus questionamentos e colaboração.

À Profa. Dra. Glauce Viana pela sua receptividade no laboratório, orientação e atenção nas discussões dos resultados.

À Profa. Dra. Norma Maria Barros Benevides pelo carinho, amizade e orientação sempre que precisei.

À Profa. Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro pelas sugestões e participação na Banca Examinadora.

À minha amiga Samya de Araújo Neves pela amizade e respeito que sempre tivemos. Durante a dissertação de mestrado estive sempre ao meu lado e esta tese começamos juntas.

As amigas Lidia de Araújo Vieira D'almeida e Márcia Rúbia Silva Melo, sempre presentes em todos os momentos, a distância pode existir, mas a amizade não acaba nunca.

Aos amigos Bartolomeu Warlene e Fábria Karine, que me auxiliaram na realização deste trabalho. Amigos que sempre estiveram presentes.

As amigas Nilka Oliveira e Thereza Sampaio, companhias adoráveis que me ensinaram muito sobre a vida.

Aos amigos do laboratório de Algas Marinhas I: Juliana, Clark, Luciano e Draúlio. Realmente somos uma família.

Aos amigos do laboratório de Algas Marinhas II: Márjorie Holanda, Maria Gonçalves, Luana e Rodrigo

À Maria Vilany pelo carinho, descontração e ajuda nos experimentos no departamento de farmacologia.

A todos os amigos que conheci no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, em especial: André, Fábio, Renata, DanieleTeixeira, Iza, kátia Leite, Rogildo Cordeiro, Fábria, Elizângela.

Aos meus primos, Delmira Rocha e João Ricardo que sempre acreditaram em mim.

Aos meus amigos fora do departamento: Evanélia, Janaina, André, Dorothy, Antônia, Lúcia Protásio, Solange Rocha, Solange Tavares, Francisco Alves, Arimatéia, Maria Imaculada, Lucineide e Maria Tereza.

Aos meus pais, Luiz Almeida e Salete Alves, minha irmã Luciana Alves e meu esposo Aldisney Campelo, por fazerem parte da minha vida.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular que sempre contribuíram com os estudantes do Departamento.

Este trabalho foi realizado com o apoio e a colaboração das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (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 pela bolsa concedida a autora.

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 auxílios de projetos e bolsas concedidas a este Departamento.

Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT), através de Convênio com o Laboratório de Lectinas (LABLEC) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa (FUNCAP), através de vários projetos financiados ao LABLEC do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), através do projeto Proteínas Vegetais desenvolvido no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Universidade Federal do Ceará, através do Centro de Ciências - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Faculdade de Medicina - Departamento de Farmacologia e Fisiologia e o Ambulatório de Endocrinologia que viabilizou a execução deste trabalho em seus laboratórios e contribuiu sobremaneira para a formação da autora.

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE QUADROS	xvi
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	xvii
RESUMO	xix
ABSTRACT	xx

CAPÍTULO 1

ALGAS MARINHAS E LECTINAS

1. <u>INTRODUÇÃO</u>	2
1.1. <u>Algas marinhas</u>	2
1.1.1. Fatores que interferem no controle da comunidade algal	3
1.1.2. Classificação	4
1.1.3. Componentes de algas	5
1.2. <u>Lectinas de algas marinhas</u>	11
1.2.1. Lectina de <i>Amansia multifida</i>	12
1.2.2. Lectina de <i>Bryothamnion triquetrum</i>	13
1.2.3. Lectina de <i>Meristiella echinocarpa</i>	13
1.3. <u>Atividades biológicas de lectinas de algas marinhas</u>	14
2. <u>OBJETIVOS</u>	17
2.1. OBJETIVO GERAL	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. <u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	18
3.1. <u>Algas marinhas</u>	18
3.2. <u>Eritrócitos</u>	18
3.3. <u>Reagentes</u>	18
3.4. <u>Purificação das proteínas</u>	19
3.4.1. Lectina de <i>Amansia multifida</i>	19
3.4.2. Lectina de <i>Bryothamnion triquetrum</i>	19

3.4.3. Lectina de <i>Meristiella echinocarpa</i>	21
3.5. <u>Determinação de proteína</u>	24
3.6. <u>Determinação da atividade hemaglutinante</u>	24
3.7. <u>Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel</u>	24
3.8. <u>Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e β-Mercaptoetanol</u>	27
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30

CAPÍTULO 2
USO DAS LECTINAS NO DIAGNÓSTICO DE DIABETES MELLITUS
TIPO 1 E TIPO 2

1. INTRODUÇÃO	37
1.1. <u>Diabetes mellitus</u>	37
1.1.1. Definição e importância do diabetes mellitus	37
1.1.2. Classificação	38
1.2. <u>Diagnóstico etiológico de referência e sua importância no diabetes mellitus</u>	42
1.3. <u>Eritrócitos e glico-hemoglobina</u>	44
1.4. <u>Alterações na membrana plasmática do eritrócito humano no diabetes</u>	45
1.5. <u>Atividade hemaglutinante e diabetes</u>	48
2. OBJETIVOS	51
3. MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1. <u>Lectinas</u>	52
3.2. <u>Eritrócitos</u>	52
3.3. <u>Regentes</u>	53
3.4. <u>Determinação da atividade hemaglutinante</u>	53
3.5. <u>Ensaio de Inibição da atividade hemaglutinante</u>	53
3.6. <u>Determinação da glico-hemoglobina</u>	54
3.7. <u>Análise estatística</u>	57
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	58
4.1. <u>Atividade hemaglutinante e diabetes</u>	58
4.2. <u>Inibição da atividade hemaglutinante e diabetes</u>	62

5. <u>CONCLUSÕES</u>	64
6. <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	65

CAPÍTULO 3

ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTIEDEMATOGÊNICA DA LECTINA DE *Meristiella echinocarpa*

1. <u>INTRODUÇÃO</u>	71
1.1. <u>Considerações gerais</u>	71
1.2. <u>Drogas analgésicas e antiinflamatórias</u>	73
1.2.1. Morfina	73
1.2.2. Indometacina	75
1.3. <u>Lectinas de algas marinhas e propriedades farmacológicas</u>	75
2. <u>OBJETIVOS</u>	78
3. <u>MATERIAIS E MÉTODOS</u>	79
3.1. <u>Animais</u>	79
3.2. <u>Reagentes</u>	79
3.3. <u>Estudo da atividade antiinflamatória</u>	79
3.3.1. Edema de pata induzido por carragenina em camundongos	79
3.3.2. Edema de pata induzido por dextrano em camundongos	80
3.4. <u>Determinação da atividade analgésica</u>	80
3.4.1. Teste das contorções abdominais pelo ácido acético (<i>Writhing Test</i>)	80
3.4.2. Teste da formalina	81
3.5. <u>Análise Estatística</u>	81
4. <u>RESULTADOS E DISCUSSÕES</u>	82
4.1. <u>Determinação da atividade antiedematogênica da lectina de <i>Meristiella echinocarpa</i></u>	82
4.1.1. Modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos	82
4.1.2. Modelo de edema de pata induzido por dextrano em camundongos	86
4.2. <u>Determinação da atividade antinociceptiva da lectina de <i>M. echinocarpa</i></u>	90

4.2.1. Teste de contorções abdominais pelo ácido acético em <i>camundongos</i>	90
4.2.2. Teste da formalina	93
5. <u>CONCLUSÕES</u>	100
6. <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	101

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

	Páginas
1. Alga Marinha <i>Amansia multifida</i> .	7
2. Alga Marinha <i>Bryothamnion triquetrum</i> .	8
3. Alga Marinha <i>Meristiella echinocarpa</i> .	9
4. Esquema de extração da lectina presente na alga marinha vermelha <i>Amansia multifida</i> .	20
5. Esquema de extração da lectina presente na alga marinha vermelha <i>Bryothamnion triquetrum</i> .	22
6. Esquema de extração da lectina presente na alga marinha vermelha <i>Meristiella echinocarpa</i> .	23
7. Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel da fração F(0/70) da alga <i>A. multifida</i> .	25
8. Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel da fração F(0/60) da alga <i>B. triquetrum</i> .	26
9. Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel do extrato concentrado da alga <i>M. echinocarpa</i> .	26
10. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e β -mercaptoetanol de <i>A. multifida</i> .	28
11. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e β -mercaptoetanol de <i>B. triquetrum</i> .	28
12. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e β -mercaptoetanol de <i>M. echinocarpa</i> .	29

CAPÍTULO 2

13. Inter-relações metabólicas no diabetes mellitus tipo 1.	40
14. Inter-relações metabólicas no diabetes mellitus tipo 2.	41
15. Eritrócito na circulação sangüínea.	45
16. Diagrama esquemático da membrana do eritrócito.	47

17. Formação de produtos avançados de proteínas glicosiladas (AGEs).	48
18. Separação da glico-hemoglobina - Introdução do separador no tubo	55
19. Separação da glico-hemoglobina – Separador é empurrado até oferecer resistência.	56

CAPÍTULO 3

20 Fórmula estrutural da morfina.	74
21 Fórmula estrutural da indometacina.	75
22 Ação da lectina de <i>M. echinocarpa</i> sobre o edema de pata induzido por carragenina (1%) em camundongos.	84
23 Ação da lectina de <i>M. echinocarpa</i> sobre o edema de pata induzido por dextrano (1,5%) em camundongos.	88
24 Ação da lectina de <i>M. echinocarpa</i> sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos.	92
25 Estudo da atividade analgésica da lectina de <i>M. echinocarpa</i> no modelo de formalina, em camundongos.	96
26 Estudo do envolvimento do sistema opióide na antinocicepção pela lectina de <i>Meristiella echinocarpa</i> no teste de formalina em camundongos.	98

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

	Páginas
1. Classificação das espécies de algas marinhas estudadas no presente trabalho.	6

CAPÍTULO 2

2. Padrão de hemaglutinação das lectinas <i>A. multifida</i> , <i>B. triquetrum</i> e <i>M. echinocarpa</i> frente a eritrócitos de pacientes diabéticos.	59
3. Glico-hemoglobina dos pacientes com diabetes mellitus tipo 1, tipo 2 e normais.	61
4. Inibição da atividade hemaglutinante das lectinas de <i>A. multifida</i> , <i>B. triquetrum</i> e <i>M. echinocarpa</i> por glicoproteínas.	63

CAPÍTULO 3

5. Efeito da lectina de <i>M. echinocarpa</i> no edema de pata induzido por carragenina.	83
6. Efeito da lectina de <i>M. echinocarpa</i> no edema de pata induzido por dextrano.	87
7. Estudo da inibição da lectina de <i>M. echinocarpa</i> , no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos.	91
8. Estudo da lectina de <i>M. echinocarpa</i> na nocicepção induzida pela formalina em camundongos.	95
9. Avaliação da participação do sistema opióide no efeito da lectina de <i>M. echinocarpa</i> , na nocicepção induzida pela formalina em camundongos.	97

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 2

	Páginas
1. Classificação do Diabetes mellitus.	39
2. Formulário utilizado na coleta de sangue.	53

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

DEAE	Dietilaminoetil
A ₂₈₀	Absorbância a 280 nm
BSA	Albumina Sérica Bovina
kDa	Kilodaltons
nm	Nanômetro
PI	Pico I
PII	Pico II
PAGE	Ewletroforese em Gel de Poliacrilamida
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
NO	Óxido Nítrico
pl	Ponto isoelétrico
TEMED	N,N,N',N' – Tetrametiletilenodiamino
PG	Prostaglandina
COX-1	Cicloxigenase 1
COX-2	Cicloxigenase 2
UH	Unidade de Hemaglutinação
AM	<i>Amansia multifida</i>
BT	<i>Bryothamnion triquetrum</i>
ME	<i>Meristiella echinocarpa</i>
Gc	<i>Gracilaria caudata</i>
PHA	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Con Br	<i>Canavalia brasiliensis</i>
Ds	<i>Digenea simples</i>
BS	<i>Bryothamnion seaforthii</i>
HbT	Hemoglobina Total
HbA1	Hemoglobina glicosilada
DM	Diabetes mellitas
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM 2	Diabetes mellitus tipo 2
i.p	Via Intraperitoneal
v.o	Via Oral
EDTA	Dietilaminoetil
HIC	Cromatografia de interação hidrofóbica
B16-BL6	Melanoma de rato
JYG-B	Carcinoma mamário de rato
KL1	Carcinoma mamário humano
HIV-1	Imunodeficiência humana
Tris	Tris (Hidroximetil) aminometano
Cst	Carboidrato sulfatado total
ADP	Adenosina difosfato
SNC	Sistema nervoso central
AINEs	Antiinflamatórios não-esteroidais
TNF- α	Fator de necrose tumoral
5-HT	5-hidroxitriptamina
CMI	Concentração mínima de inibição
GAD	Descarboxilase do ácido glutâmico

GABA	Ácido gama-amino-butírico
JDF	Juvenil Diabetes Foundation
IAA	Anticorpo antiinsulina
ICA	Anticorpo antiilhota
MODY	Maturity-Onset Diabetes of the Young
DPT	Diabetes Prevention Trial
NPT	Nicotinamida Preventiol Trial
LADA	Latent Autoimmune Diabetes Mellitus in Adults
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
AGEs	Advanced glycation endproducts
AOPP	Produtos avançados da oxidação das proteínas
MPO	Mieloperoxidase
VE	Volume do edema
VI	Volume inicial
VF	Volume final
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa
NSAIDs	Drogas antiinflamatórias não-esteroidais

RESUMO

As algas marinhas vermelhas *Amansia multifida* (AM), *Bryothamnion triquetrum* (BT) e *Meristiella echinocarpa* (ME), foram coletadas nos recifes de maré na praia de Flexeiras, Município de Trairí, Estado do Ceará. Para o desenvolvimento do trabalho foram isoladas as lectinas destas algas e comparadas quanto a atividade hemaglutinante contra eritrócitos de indivíduos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e sadios euglicêmicos. Já é sabido que estas lectinas não aglutinam eritrócitos humanos do sistema ABO, mas foram capazes de causar hemaglutinação frente a eritrócitos de pacientes com DM1 e DM2. As lectinas das algas apresentaram valores de hemaglutinação de $45,16 \pm 8,83$ (AM); $6,52 \pm 1,78$ (BT) e $80,64 \pm 22,58$ (ME) UH/mL, para DM1 e, $161,01 \pm 45,62$ (AM); $3,45 \pm 0,89$ (BT) e $652,95 \pm 130,41$ (ME) UH/mL, para DM2. Os maiores valores foram observados com a lectina ME que diferenciou claramente de DM1 e DM2, sugerindo que estas lectinas possam ser utilizadas como diagnóstico etiológico do diabetes mellitus ou diferenciação entre DM1 e DM2. Foi realizado também ensaio de inibição da atividade hemaglutinante com os eritrócitos de pacientes diabéticos na presença das glicoproteínas avidina, fetuína e manana, reconhecidamente inibidoras da atividade hemaglutinante dessas lectinas. Com esse ensaio foi observado a importância do sítio de ligação a carboidrato das algas BT e ME para a atividade hemaglutinante. Estudos farmacológicos envolvendo a lectina ME complementaram este estudo, quando foram avaliadas as atividades antinociceptiva e antiedematogênica em camundongos. O resultado demonstrou que a lectina apresentou efeito antiedematogênico nas doses 1 e 10 mg/Kg i.p. e 10 mg/Kg v.o., por injeção de carragenina e, nas doses 1 e 5 mg/Kg i.p. e 5 mg/kg v.o. por injeção de dextrano. A lectina ME diminuiu o número de contorções abdominais, via i.p. e v.o. (0,001; 0,01; 5 e 10 mg/Kg). No teste da formalina, a lectina ME nas doses 1; 5 e 10 mg/Kg i.p. e v.o., diminuiu o tempo de lambadura da pata na primeira e segunda fase do teste. Este efeito foi revertido com a naloxona, sugerindo que sua atividade envolve a ativação de receptores opióides semelhante a morfina. A lectina de ME mostrou possuir propriedades analgésicas e antiinflamatórias.

ABSTRACT

The red seaweeds *Amansia multifida* (AM), *Bryothamnion triquetrum* (BT) and *Meristiella echinocarpa* (ME), had been collected in reefs of tide in the beach of Flexeiras, City of Trairi, State of Ceará. For the development of the work the lectins of these seaweed had been isolated and compared about the hemagglutination activity against erythrocytes of individuals with diabetes mellitus type 1 (DM1), type 2 (DM2) and healthy individuals with normal sugar level. Already it is known that these lectins do not agglutinate human erythrocytes of system ABO, but had been capable to cause hemagglutination front the erythrocytes of patients with DM1 and DM2. The lectins of the seaweed had presented values of hemagglutination of $45,16 \pm 8,83$ (AM); $6,52 \pm 1,78$ (BT) e $80,64 \pm 22,58$ (ME) UH/mL, para DM1 e, $161,01 \pm 45,62$ (AM); $3,45 \pm 0,89$ (BT) e $652,95 \pm 130,41$ (ME) UH/mL, The biggest values had been observed with the ME lectin that clearly differentiated DM1 and DM2, suggesting that these lectinas can be used as etiologic diagnosis of diabetes mellitus or differentiation between DM1 and DM2. It was also carried through assay of inhibition of the hemagglutination activity with the erythrocytes of diabetic patients in the presence of glycoproteins avidin, fetuin and mannan, admittedly inhibiting of the hemagglutination activity of these lecithins. With this assay was observed the importance of the linking site to the carbohydrate of the seaweed BT and ME for the hemagglutination activity. Pharmacologic studies involving the ME lectins had complemented this study, when the antinociceptive and antiedematogenic activities in mice had been evaluated. The result demonstrated that the lectins presented antiedematogenic effect in doses 1 and 10 mg/Kg i.p. and 10 mg/Kg p.o., for carrageenin injection and, in 1 and 5 mg/Kg i.p doses and 5 mg/kg p.o for dextran injection. The ME lectins diminished the number of abdominal contortions, i.p and p.o. (0,001; 0,01; 5 and 10 mg/Kg). In the test of the formalin, the ME lectins in doses 1; 5 and 10 mg/Kg i.p and p.o., diminished the time of licking the leg in the first and the second phase of the test. This effect was reverted with naloxone, suggesting that its activity involves the activation of opium receivers similar to morphine. The ME lectins showed to possess analgesics and anti inflammatory properties.

**CAPÍTULO 1: ALGAS MARINHAS E
LECTINAS**

1. INTRODUÇÃO

1.1. Algas marinhas

No Brasil, na região costeira compreendida entre o estado do Ceará e o norte do estado do Rio de Janeiro, se encontra a flora algal mais diversificada do país. No que se refere à exploração de espécies com fins comerciais, a atividade de maior porte corresponde à coleta de algas vermelhas no litoral do nordeste, principalmente na costa entre os estados do Ceará e da Paraíba (www.bdt.fat.org.br – Acessado em 12/10/05).

A exploração comercial de algas marinhas, em grande parte baseada no cultivo de espécies comestíveis ou produção de ágar, carragenana e alginatos, se tornou uma indústria que gera milhões de dólares. Nos últimos anos, empresas farmacêuticas estão utilizando os organismos marinhos, incluindo as algas marinhas, em busca de novas substâncias naturais, para utilização em pesquisas médicas e bioquímicas (SMIT, 2004).

Cerca de 4 milhões de toneladas de algas são colhidas anualmente em todo o mundo, sendo os chineses e japoneses os seus principais produtores, seguidos pelos norte-americanos e noruegueses. A partir das algas é possível a obtenção de produtos a baixo custo, que são de grande importância para a vida do homem moderno (ARMISEN, 1995).

As algas pertencem a vários grupos taxonômicos heterogêneos caracterizados por terem a capacidade de se difundirem em ambientes susceptíveis à colonização (PEREZ-LORENZO et al., 1998), e constituem um grupo muito diversificado de organismos, pouco relacionados entre si, a não ser pelo fato de possuírem *clorofila a* e liberarem oxigênio no processo de fotossíntese. Exatamente por isso, desempenham um papel fundamental nos ecossistemas aquáticos como produtores primários, constituindo a base das cadeias alimentares em rios, lagos e oceanos (PANORAMA DA AQUICULTURA, 1997).

Portanto, as algas são organismos encontrados em todos os meios, como em águas doces, na água do mar, sobre os solos úmidos ou mesmo sobre a neve, desde que lhes ofereçam luz e umidade suficientes, temporários ou permanentes.

As algas retiram do meio onde estão, todos os nutrientes que precisam e, portanto, são organismos fundamentalmente aquáticos (BHATTACHARYA e MEDLIN, 1998).

Nos sistemas aquáticos, as algas são muito importantes pois, incorporam energia solar em biomassa, produzem oxigênio que é dissolvido na água e usado pelos demais organismos aquáticos, atuam na mineralização e no ciclo dos elementos químicos, e servem como alimento para animais herbívoros e onívoros. Quando morrem, seus constituintes químicos sofrem transformações nos sedimentos, são solubilizados e reciclados na água. A temperatura, a intensidade da radiação solar, a concentração de nutrientes na água e alimentação dos animais presentes no sistema são fundamentais para as diferentes funções que são desempenhadas pelas algas (VIDOTII e ROLLEMBERG, 2004).

As alterações naturais ou antropogênicas no ambiente aquático podem alterar o balanço destes fatores controlados e causar alterações na composição da comunidade de algas, nas taxas de produtividade, na biomassa e na química da água. É importante observar que, tanto a diminuição como a estimulação do crescimento dos organismos são igualmente indesejáveis, pois qualquer alteração na produtividade das algas ou na composição da comunidade, em relação ao usual para aquele sistema, pode ameaçar todo o equilíbrio do ecossistema (BLANCK et al., 1984).

1.1.1. Fatores que interferem no controle da comunidade algal

As comunidades de algas são controladas por muitos fatores ambientais, *bióticos e abióticos, os quais podem, por sua vez, ser afetados por espécies químicas estranhas ao meio (contaminantes)*. As algas podem sofrer efeitos diretos, em curtos tempos e também efeitos indiretos, decorrentes dos efeitos diretos sobre *outros organismos no meio. Existem interações entre a comunidade de algas e o ambiente que apresentam estes efeitos, podendo causar vantagens e desvantagens às algas* (VIDOTII e ROLLEMBERG, 2004).

✓ Algas – macrófitas ⇒ não se sabe ao certo o papel das macrófitas, mas parece que elas absorvem nitrogênio e fósforo inorgânicos dissolvidos, competindo com as algas pelos nutrientes.

✓ Algas – zooplâncton ⇒ as algas são o alimento principal para os invertebrados aquáticos, e isso pode afetar a população de duas maneiras: uma taxa de alimentação moderada pode estimular o crescimento e a produção de algas,

aumentando a velocidade de reciclagem dos nutrientes ou uma grande taxa de alimentação reduz a abundância de algas.

✓ Algas – substâncias orgânicas ⇒ compostos organoclorados agem diretamente sobre as algas inibindo a fotossíntese; compostos organofosforados são ainda mais tóxicos na inibição da fotossíntese das algas. Herbicidas diminuem a biossíntese dos lipídeos nas algas.

✓ Algas – íons metálicos ⇒ íons de metais divalentes (Cu, Cd, Hg, Pb, Zn,...) podem reduzir a fotossíntese causando dano estrutural aos cloroplastos; pequenas quantidades de cobre, inibem a fixação de N, reduzindo o processo de eutrofização.

✓ Algas – luz ⇒ muitas espécies não toleram níveis elevados de luz, sendo rapidamente afetadas pela ação da radiação (VIDOTII e ROLLEMBERG, 2004).

Em decorrência das interações, podemos pensar que alguns desses fatores aliado a exploração exagerada das algas, podem afetar o ecossistema e provocar extinção em nosso estado da alga marinha vermelha *Meristiella echinocarpa*, uma das algas estudadas neste trabalho.

1.1.2. Classificação.

As algas são separadas pelo tamanho em dois grupos: as algas microscópicas (*microalgas*), invisíveis a olho nu, e as algas macroscópicas (*macroalgas*), com tamanhos que variam de alguns milímetros a algumas dezenas de metros (PANORAMA DA AQUICULTURA, 1997).

As *macroalgas* são apresentadas em três divisões: *Chlorophyta* (algas verdes), *Phaeophyta* (algas pardas) e *Rhodophyta* (algas vermelhas) (RAVEN et al., 1996).

Quase todas as *rodofíceas* são marinhas, e sua característica principal se refere aos cromatóforos, os quais possuem um pigmento vermelho, a ficoeritrina. Este pigmento geralmente se une a ficocianina, em proporções variáveis, de maneira que a cor definitiva dessas algas varia desde o roxo vivo ao vermelho claro. Essas algas estão adaptadas a uma iluminação pouca intensa e, por isto, são encontradas no raso (www.pwp.netcabo.pt/naturosofia - Acessado em 09/09/05).

A classe *Rhodophyceae* possui o maior número de algas já estudadas. Cerca de 4000 espécies de algas vermelhas são abundantes nas águas tropicais quentes, podendo ser encontradas também nas regiões mais frias do mundo, como nos pólos.

A **TABELA 1** indica a classificação geral das algas vermelhas *Amansia multifida* (**FIGURA 1**) e *Bryothamnion triquetrum* (**FIGURA 2**), pertencentes à ordem Ceramiales, família Rhodomelaceae e, a alga *Meristiella echinocarpa* (**FIGURA 3**), pertencente à ordem Gigartinales, família Solieriaceae, empregadas no presente estudo.

A ordem Ceramiales é um grupo bem sucedido dentre as algas vermelhas por apresentarem uma vasta distribuição mundial e corresponderem a quase metade dos gêneros descritos para as algas vermelhas. Essa ordem é composta por quatro famílias, sendo elas, Ceramiaceae, Delesseriaceae, Dasyaceae e Rhodomelaceae, sendo a ordem Gigartinales composta por 21 famílias e cerca de 80 gêneros (KRAFT, 1981).

A Rhodomelaceae é a maior família encontrada dentro da divisão Rhodophyta, sendo constituída por 125 gêneros e 600-650 espécies. O maior gênero encontrado em tal família é o Polysiphoria, formado por cerca de 200 espécies (KRAFT, 1981).

Essas macroalgas apresentam distribuição mundial, são comuns ao longo de toda a costa brasileira, sendo, entretanto, mais abundantes e diversificadas em áreas com substrato rochoso e águas mais transparentes, como é o caso da costa Nordeste do país (HORTA e OLIVEIRA, 2004).

1.1.3. Componentes de algas

O crescente interesse em produtos químicos de origem marinha tem conduzido à descoberta de novos componentes biologicamente ativos e, as algas marinhas têm sido objeto de crescente estudo com este propósito (AMICO, 1995).

As algas têm sido destacadas por conterem alta quantidade de macromoléculas solúveis em água tais como polissacarídeos, proteínas, glicoproteínas e outros componentes menos polares e de baixo peso molecular, alguns deles exibindo, *in vitro*, propriedades biológicas particulares.

Dos polissacarídeos podemos obter produtos químicos diversos, como ficocolóides ou colóides de algas (PANORAMA DE AQUICULTURA, 1997). Estas últimas substâncias são classificadas em três grupos básicos em função de sua estrutura química e propriedades reológicas: os ágaros (ágar-ágar) ou agaranas, as carragenanas e os alginatos (RAVEN et al, 1996).

TABELA 1: Classificação das algas marinhas estudadas no presente trabalho.

Classe: Rhodophyceae

Subclasse: Florideophycidae

Ordem: Ceramiales

Família: Rhodomelaceae

Gênero: *Amansia*

Espécie: *Amansia multifida*

Gênero: *Bryothamnion*

Espécie: *Bryothamnion triquetrum*

Ordem: Gigartinales

Família: Solieriaceae

Gênero: *Meristiella*

Espécie: *Meristiella echinocarpa*

Fonte: WYNNE (1998).



FIGURA 1: Alga marinha vermelha *Amansia multifida*.



FIGURA 2: Alga marinha vermelha *Bryothamnion triquetrum*.



FIGURA 3: Alga marinha vermelha *Meristiella echinocarpa*.

As carragenanas são galactanas sulfatadas, solúveis em água, extraídas de algas vermelhas. Suas estruturas e composição variam de acordo com a espécie, ecofisiologia e ciclos reprodutivos (AMIMI et al, 2001). Enquanto, os alginatos estão presentes nas algas pardas, como os mais abundantes polissacarídeos, os quais atuam na composição estrutural dessas algas, o ágar é utilizado na indústria farmacêutica e na cultura de bactérias, a carragenana é utilizada como emulsionante ou estabilizante (www.pwp.netcabo.pt/naturosofia - Acessado em 11/10/05).

A classe Rhodophyceae apresenta o maior número de hemaglutininas isoladas e caracterizadas. Muitos protocolos para extração de proteínas têm sido publicados (FLEURENCE et al., 1995). Em geral, eles fornecem apenas um suporte inicial para pesquisas.

Os primeiros relatos da presença de hemaglutininas em algas foram realizados por BOYD et al. (1966), quando concluíram que extratos de algas marinhas interagindo com células vermelhas do sistema ABO foram capazes de causar aglutinação de modo específico. A primeira hemaglutinina isolada e caracterizada, foi proveniente da alga marinha *Ptilota plumosa* (ROGERS et al., 1977; ROGERS e BLUNDEN, 1980).

Em decorrência de suas propriedades seletivas, as hemaglutininas ou lectinas são definidas como proteínas de origem não imune, que possuem um ou mais sítios de ligação a carboidrato, mesmo incluindo enzimas, desde que esses sítios não sejam requeridos para atividade catalítica (PEUMANS e VAN DAMME, 1995a).

Esta definição é a mais recente e amplia o grupo de proteínas que se comportam como lectinas, mas são diferentes do ponto de vista de suas propriedades aglutinantes e/ou de precipitação de glicoconjugados. Baseando-se nessa definição, as lectinas foram, divididas conforme PEUMANS e VAN DAMME (1995b) e VAN DAMME et al. (1998) em quatro grupos principais:

✓ Merolectinas: inclui lectinas pequenas, que possuem exclusivamente um sítio de ligação à carboidratos e, por causa de sua natureza monovalente, não são capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Exemplos dessa classe são as proteínas monoméricas das orquídeas (VAN DAMME et al., 1994).

✓ Hololectinas: possuem dois ou mais domínios de ligação à carboidrato que podem ser idênticos ou homólogos. A este grupo pertencem muitas lectinas de plantas, que apresentam múltiplos domínios ligantes e são, portanto, potencialmente capazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados.

✓ Quimerolectinas: proteínas que além do domínio ligante à carboidrato, possuem um outro domínio, apresentando uma atividade catalítica (ou outra atividade biológica) bem definida, mais que age independente dos domínios ligantes à carboidratos, e que, dependendo do número destes sítios ligantes a carboidratos, podem comportar-se como merolectinas ou hololectinas.

✓ Superlectinas: são um tipo especial de quimerolectinas. Elas são proteínas que possuem dois ou mais sítios de ligação a carboidratos, os quais são, estruturalmente distintos e reconhecem carboidratos diferentes. Apenas um exemplo desta classe é conhecido, a lectina de bulbos de tulipa (CAMMUE et al., 1986).

1.2. Lectinas de algas marinhas

As lectinas são encontradas em quase todos os organismos vivos, incluindo plantas, fungos, animais (vertebrados e invertebrados), microorganismos, vírus e algas (LIS e SHARON, 1998). Elas têm sido isoladas e caracterizadas de várias fontes biológicas, principalmente vegetais superiores. Embora em muitos estágios, seu exato papel biológico não seja esclarecido, as lectinas vêm sendo analisadas como ferramentas bioquímicas em biotecnologia e pesquisas biomédicas (GABIUS e GABIUS, 1997; LIS e SHARON, 1998), devido sua notável propriedade de reconhecimento a carboidrato (AMBROSIO et al., 2003).

Lectinas de algas marinhas diferem das lectinas de plantas em uma variedade de propriedades. Em geral, possuem: baixa massa molecular, não apresentam afinidade por açúcares simples, mas por oligossacarídeos complexos, não requerem cátions divalentes para sua atividade biológica (ROGERS e HORI, 1993). Elas ocorrem principalmente em formas monoméricas e têm grandes proporções de aminoácidos ácidos com pontos isoeletrônicos entre 4 e 6 (SHIOMI et al., 1981; HORI et al., 1990).

A maioria das lectinas de plantas terrestres pode ser classificada dentro das famílias de proteínas estruturalmente e evolucionariamente conhecidas. Ao contrário destas, as lectinas de algas têm sido isoladas e caracterizadas em passos lentos. Sendo o primeiro relato da atividade hemaglutinante a mais ou menos 35 anos atrás (AMBROSIO et al., 2003). Além disso, os dados bioquímicos e estruturais das lectinas de algas ainda são escassos, e desses somente poucas espécies são

conhecidas. Por isso, a classificação funcional e filogenética destas lectinas não é bem conhecida (MELO et al., 2004).

Várias lectinas de algas têm sido isoladas de algas marinhas vermelhas, tais como *Bryothamnion triquetrum* (AINOUZ et al., 1995), *Amansia multifida* (COSTA et al., 1999), *Solieria filiformis* (BENEVIDES et al., 1996), *Pterocladella capillacea* (OLIVEIRA et al., 2002) e *Hypnea musciformis* (NAGANO et al., 2002).

Diversos métodos convencionais de purificação de proteínas têm sido utilizados para a grande maioria das lectinas de algas marinhas, e em alguns casos a técnica de cromatografia de afinidade foi empregada (ROGERS et al., 1994; BENEVIDES et al., 2001; SAMPAIO et al., 1999; 2002; HOLANDA et al., 2005).

As cromatografias de troca iônica têm se mostrado de grande utilidade em procedimentos de purificação de lectinas de algas, devido a eliminação dos pigmentos característicos das algas marinhas vermelhas, sendo geralmente utilizada de forma isolada ou em combinação com outros procedimentos cromatográficos (SAMPAIO, 1992; BENEVIDES et al., 1998; ANDRADE, 2004; COSTA et al., 1999; NEVES, 1999).

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 et al., 1990).

As primeiras lectinas a terem suas estruturas primárias elucidadas foram as isoladas das algas marinhas vermelhas *Bryothamnion triquetrum* e *Hypnea japonica* por CALVETE et al. (2000) e HORI et al. (2000), respectivamente. Estas lectinas contêm cerca de 91 resíduos de aminoácidos e um alto grau de homologia, mas não apresentam qualquer similaridade com lectinas de plantas, indicando que elas pertencem a uma nova família de proteínas.

1.2.1. Lectina de *Amansia multifida*

COSTA et al. (1999) purificou a lectina presente na alga marinha vermelha *Amansia multifida* por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel, seguida da cromatografia de interação hidrofóbica (HIC) em coluna de Phenyl-Sepharose 4B ou por cromatografia de afinidade em coluna de avidina-Sepharose 4B. A lectina aglutinou eritrócitos de coelho e porco. Tratamento com EDTA não teve nenhum efeito na atividade hemaglutinante. A lectina purificada é uma glicoproteína

com 2,9%, de sua massa molecular aparente de 14 kDa, correspondendo ao componente glicídico, como observado por filtração em gel e 32 kDa por PAGE-SDS em presença de β -mercaptoetanol. A atividade hemaglutinante desta proteína não foi inibida por açúcares simples, mas o foi por avidina (4,8 μ g/mL), fetuína, "egg white" e manana. A focalização isoeétrica revelou a presença de cinco isolectinas com ponto isoeétricos variando de 5.45 a 6.25.

1.2.2. Lectina de *Bryothamnion triquetrum*

A lectina presente na alga *Bryothamnion triquetrum* (BT) (AINOUZ et al. 1995) foi isolada após tratamento ácido do extrato para a remoção dos pigmentos. Em seguida, precipitação na presença de sulfato de amônio para a obtenção da fração protéica (F 0/70), quando foi posteriormente aplicada em cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel. A lectina não foi inibida por açúcares simples, mas pelas glicoproteínas fetuína, mucina e avidina, e não é dependente de cátions divalentes. Apresentou massa molecular aparente por filtração em gel de 3.500 Da. A lectina purificada apresentou uma única banda em PAGE-SDS e não foi modificada com adição de uréia 8M ou β -mercaptoetanol, indicando que BT é uma proteína monomérica.

1.2.3. Lectina de *Meristiella echinocarpa*

A lectina presente na alga marinha vermelha *Meristiella echinocarpa* foi purificada por FARIAS (1995) através de cromatografia de afinidade em coluna de manana-Sepharose 4B. A atividade hemaglutinante foi somente inibida pelas glicoproteínas fetuína, "egg white", avidina, mucina e manana, sendo esta a mais potente. A focalização isoeétrica do material purificado revelou cinco bandas distintas com valores de pI de 4.75, 4.85, 5.20, 5.75 ou 6.25. A lectina aglutinou frente a eritrócitos de coelho e de porco modificados enzimaticamente. A atividade não é dependente de cátions divalentes e a lectina foi relativamente resistente a pH alcalino, mas sensível a tratamento ácido. A atividade hemaglutinante foi completamente abolida quando aquecida a 60°C por 15 minutos.

1.3. Atividades biológicas das lectinas de algas marinhas

Lectinas de algas marinhas constituem atualmente um grupo importante de moléculas, entretanto, o número de trabalhos de aplicações biológicas envolvendo sua utilização, ainda é reduzido. Os baixos rendimentos destas proteínas, durante as etapas de isolamento e purificação, é uma dificuldade inicial na sua utilização em estudos de aplicações biológicas (NEVES et al., 2001).

Um dos mais importantes efeitos da interação de lectinas com células tem relação com a capacidade dessas proteínas de estimular resposta mitogênica em linfócitos. A interação lectina-carboidrato, que ocorre nos eventos moleculares, é essencial para a resposta imune. Lectinas são portanto, utilizadas como reagentes policlonais para investigar o controle e as bases moleculares da ativação e proliferação de linfócitos, para identificar e fracionar células do sistema imune e como drogas (SINGH et al., 2004).

NEVES et al. (2001) mostraram que as lectinas isoladas das algas *Bryothamnion triquetrum* (BT), *Bryothamnion seaforthii* (BS), *Amansia multifida* (AM) e *Gracilaria caudata* (GC) apresentaram atividade indutora de migração de neutrófilos *in vivo* e *in vitro*. A lectina de (BT) foi mais potente, quando o ensaio foi realizado em ratos, enquanto a lectina de (AM) quando testada em camundongos induziu melhor a migração. Todas as lectinas induziram significativamente a migração de neutrófilos em humanos nos testes *in vitro*, sendo (BT) e (GC) as mais efetivas. A avaliação no efeito inflamatório das lectinas mostrou que D-manose reduziu a migração de neutrófilos para o foco inflamatório tanto *in vitro* como *in vivo*, com exceção da lectina de (AM). Esses dados são surpreendentes já que as lectinas de algas são inibidas por glicoproteínas e não por açúcares.

As lectinas de *Meristiella echinocarpa* (FARIAS, 1995) e *Amansia multifida* (LIMA et al., 1998) apresentaram atividade mitogênica sobre células mononucleares do sangue periférico humano em baixas concentrações e foram capazes de transformar as células blásticas ocasionando a mitose destas células *in vitro*. As isolectinas de *M. echinocarpa* foram inibidoras do efeito mitogênico das lectinas de *Phaseolus vulgaris* (PHA) e *Canavalia brasiliensis* (Con Br) em doses bastante estimulatórias (FARIAS, 1995). Enquanto, as células incubadas com concentração estimulatória de amansina produz IFN- γ . A análise de cultura estabeleceu uma correlação direta entre IFN- γ e a capacidade mitogênica e anti-mitogênica de

amansina (LIMA et al., 1998). Esta atividade mitogênica pode ser afetada por alterações que ocorram na superfície de linfócitos e modificação química da lectina (LIS e SHARON, 1981).

A atividade mitogênica em linfócitos de ratos também tem sido demonstrada utilizando a lectina de *Eucheuma serra* (KAWAKUBO et al., 1997).

LIU et al (1997) estudaram a atividade imunomodulante de oito extratos de algas marinhas somente pelo sistema *in vitro*. Nos experimentos preliminares, eles observaram que administração oral dos extratos das algas, suprimiu o crescimento do tumor transplantado em ratos e restaurou as funções imunes enfraquecidas em direção ao tumor. Os resultados sugerem que algumas algas marinhas e seus componentes fracionados, podem ser aplicados clinicamente para a modulação das funções imunes.

A alga marinha vermelha *Marginisporum crassissimum* (Yendo) Ganesan, apresentou efeito anti-tumor (anti-metástase) *in vitro* e *in vivo*. Nos experimentos *in vitro*, os extratos desta alga inibiu não somente o crescimento de algumas células tumorais, como, B16-BL6 (melanoma de rato), JYG-B (carcinoma mamário de rato) e KLP-1 (carcinoma mamário humano), mas também, a invasão das células B16-BL6 no sistema de cultura. Contudo, nos experimentos *in vivo*, a metástase do pulmão com células inoculadas de B16-BL6 na extremidade da veia de ratos, foi inibida pela administração intraperitoneal do extrato da alga (HIROISHI et al., 2001).

O extrato aquoso, a quente, da alga *Digenea simplex* (DS) tem sido utilizado com uma droga natural para arcaridíase. Várias pesquisas são realizadas na busca de drogas naturais para combater o vírus da imunodeficiência humana sem muitas reações aos pacientes. O extrato total de DS apresentou atividade anti-vírus da imunodeficiência humana (HIV-1) *in vitro*. O extrato inibiu o efeito citopático de HIV-1 para células MT-4, como também, a formação de células Molt-4 infectadas com HIV-1 (SEKINE et al., 1995).

A lectina purificada da alga *Solieria filiformis* inibiu o crescimento de cinco espécies de bactérias Gram-negativas (*Serratia marcescens*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus sp.* e *Pseudomonas aeruginosa*) e, sob as mesmas condições de ensaio, estimulou o crescimento de uma bactéria Gram-positiva (*Bacillus cereus*). A estimulação do crescimento dessa bactéria Gram-positiva foi abolida quando a lectina foi previamente incubada com

manana, seu hapteno. Esses dados podem sugerir o envolvimento do sítio de ligação da lectina no seu efeito estimulatório (HOLANDA et al., 2005).

A toxina e lectina da alga *Solieria filiformis* mostraram-se tóxicas ao ciclo evolutivo do ectoparasita *Boophilus Microplus*, indicando que estudos posteriores com as lectinas de algas marinhas possam contribuir para o controle de *B. Microplus* NASCIMENTO (2003).

Os estudos preliminares de atividade tóxica do extrato total, da toxina e da lectina de *Gracilaria cornea* sobre o ciclo de vida do carrapato bovino *Boophilus microphilus* demonstraram que estas frações proteicas afetaram algumas fases do ciclo de vida desse ectoparasita, sendo mais acentuados os efeitos tóxicos produzidos pela lectina e o extrato bruto, sendo que este último efeito sugere a presença de outro(s) componente(s) tóxicos no extrato (LIMA et al., 2005).

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

Lectinas de quatro espécies de algas (*Hypnea japonica*, *Solieria robusta*, *Boodlea coacta* e *Carpopellis flabellata*), foram capazes de inibir a agregação plaquetária humana induzida ADP, podendo ser útil na análise de glicoconjugados das membranas plaquetárias e como novos inibidores de agregação plaquetária (MATSUBARA et al., 1996).

A aglutinina de *Codium fragile* ssp *tomentosoides* foi a primeira lectina de alga marinha utilizada em aplicações nos testes histoquímicos. O uso de glicoconjugados lectina-ouro coloidal, é um sistema modelo para mapeamento de glicoproteínas de membranas. Entretanto, a sua baixa massa molecular permite um fácil acesso a diferentes pontos da superfície das células de vários tecidos (GRIFFIN et al., 1995).

Recentemente, as lectinas de *Bryothamnion triquetrum* e *Bryothamnion seaforthii*, foram examinadas quanto a sua potencialidade anticariogênica. Os resultados encontrados apontam para um grande potencial anticárie dessas moléculas, sendo possível a utilização destas tanto como ferramentas de estudo na caracterização glicídica de película adquirida, quanto na profilaxia, visto que existem dois mecanismos de ação potencialmente eficazes: a inibição da adesão bacteriana a película adquirida do esmalte e o efeito antibacteriano (TEIXEIRA, 2005).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Obtenção das lectinas das algas marinhas vermelhas *Amansia multifida* J. V. Lamouroux (AM), *Bryothamnion triquetrum* (S. G. Gmel.) M. Howe (BT) e *Meristiella echinocarpa* D. P. Cheney e P. W. Gabrielson (ME).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o potencial das lectinas obtidas na distinção entre diabéticos tipo 1, tipo 2 e indivíduos não diabéticos.
- ✓ Analisar o potencial analgésico da lectina de *Meristiella echinocarpa*..

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Algas marinhas

As algas marinhas *Amansia multifida* J. V. Lamouroux, *Bryothamnion triquetrum* (S. G. Gmel.) M. Howe e *Meristiella echinocarpa* D. P. Cheney e P. W. Gabrielson foram coletadas periodicamente em marés baixas (-0,2 a 0,3) na Praia de Flecheiras, município de Trairí, litoral cearense. As amostras coletadas foram levadas para o laboratório em recipiente isotérmico, lavadas com água destilada, separadas das epífitas e estocadas em sacos plásticos a -20°C para posterior utilização. As algas estão catalogadas no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, com os seguintes números de identificações: *Amansia multifida* EAC: 32186, *Bryothamnion triquetrum* EAC: 31138 e *Meristiella echinocarpa*.

3.2. Eritrócitos

→ Coelho

Amostras de sangue de coelho albino foram obtidos de animais adultos e saudáveis, mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

Os eritrócitos de coelho foram lavados 3 vezes com NaCl 0,15 M, após a determinação do hematócrito foi preparada uma suspensão a 2%. Em seguida, foi feito tratamento enzimático adicionando-se à suspensão 0,1 mg/10mL da enzima tripsina. Os eritrócitos foram mantidos em contato com a enzima por cerca de 1 hora a 25°C , com agitação ocasional, lavados então 6 vezes com NaCl 0,15 M e, finalmente ressuspensos de modo a se obter uma concentração final de eritrócitos a 2%.

3.3. Reagentes

- Ácido acético glacial – (Merck, Alemanha); Acrilamida – (Sigma, U.S.A.); Albumina Sérica Bovina – (Sigma, U.S.A.); Compassion Brilliant Blue G-250 – (SERVA – Feinbiochemica GmbH & Co); DEAE-Sephacel – (Merck, Darmstadt, Alemanha); Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) – (Biorad); Marcadores para eletroforese, kit de proteínas com peso molecular de 14,2 - 66,0 KDa. – (SIGMA

Chemical Co., St Louis USA); β -Mercaptoetanol – (Sigma, U.S.A.); N,N'-metilenobisacrilamida – (Sigma, U.S.A.); Persulfato de Amônio – (Bioreagnet); TEMED – (Sigma, U.S.A.); Tripsina – (Sigma, U.S.A.).

- Os demais reagentes foram de grau analítico e, obtidos comercialmente.

3.4. Purificação das proteínas

3.4.1. Lectina de *Amansia multifida*

A lectina da alga marinha vermelha *Amansia multifida* Lamouroux (AM) foi isolada através da metodologia descrita por COSTA et al. (1999). A alga fresca foi submetida a extração em tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0, contendo NaCl 0,15 M na relação 1:3 (peso/volume), durante 4 horas de contato a 4 °C, o material foi filtrado e centrifugado a 7.000 x g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido, denominado extrato total, foi tratado com sulfato de amônio até 70% de saturação por quatro horas à temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada a 7.000 x g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi descartado e o precipitado ressuspense em tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0, sendo em seguida dialisado exaustivamente contra o mesmo tampão, sob constante agitação, para a obtenção da fração F(0/70). Esta fração foi cromatografada em coluna de DEAE-Sephacel, equilibrada com tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0, após a eluição do primeiro pico (PI-DEAE) contendo atividade hemaglutinante e livre de pigmentos, foi liofilizado e estocado para posterior utilização de acordo com o esquema da **FIGURA 4**. O grau de pureza da preparação foi avaliado por eletroforese.

3.4.2. Lectina de *Bryothamnion triquetrum*

A hemaglutinina de *Bryothamnion triquetrum* (S. G. Gmel) M. Howe) (BT) foi obtida segundo AINOUZ et al. (1995). A alga fresca foi macerada na presença de nitrogênio líquido e reduzida a pó. Tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0 contendo NaCl 0,15 M, na proporção de 1:3 (p:v), foi adicionado à farinha de alga, deixado em contato por 4 horas à temperatura ambiente, filtrada em tecido de nylon e centrifugada a 10.000 x g a 4°C por 30 minutos. O sobrenadante obtido,

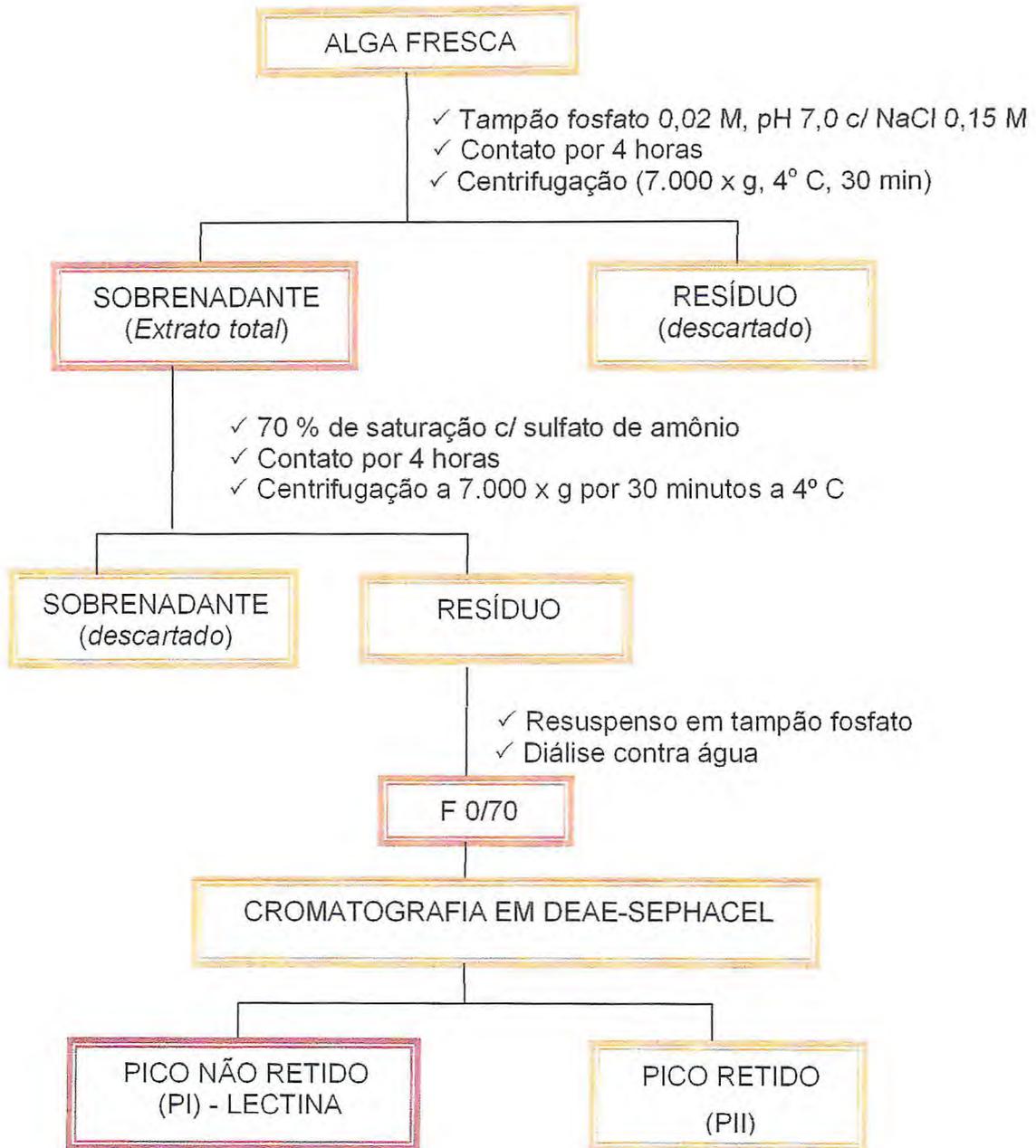


FIGURA 4: Esquema de extração da lectina presente na alga marinha vermelha *Amansia multifida* (COSTA et al., 1999).

chamado extrato total, foi acidificado a pH 1,0 com HCl concentrado, com o intuito de precipitar a maior parte dos pigmentos presentes na alga e, deixado em repouso a 10°C por 12 horas. Após esse período, o material foi centrifugado a 10.000 x g a 4°C por 30 minutos, o precipitado foi descartado e o sobrenadante teve o seu pH ajustado a 7,0 com NaOH 2 N. Após a neutralização, o sobrenadante foi tratado com sulfato de amônio a 60% de saturação, por 12 horas de contato. Em seguida, a suspensão foi submetida a uma última centrifugação a 10.000 x g a 4°C por 30 minutos e o precipitado obtido ressuspensão em água destilada, dialisado para retirada do sal, obtendo uma fração F (0/60).

A fração F(0/60) foi dialisada com tampão fosfato 0,02 M, pH 7,6 e aplicada em uma coluna de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel. O primeiro pico, não adsorvido a matriz, (PI), foi obtido pela lavagem da coluna com o tampão de equilíbrio (fosfato 0,02 M, pH 7,6) encerrando toda atividade hemaglutinante (**FIGURA 5**). Em seguida, foi realizado eletroforese.

3.4.3. Lectina de *Meristiella echinocarpa*

A obtenção da lectina de *Meristiella echinocarpa* (Areschoug) Cheney et Gabrielson (ME) foi realizada através de adaptações aos esquemas descritos por FARIAS (1995). Exemplos de *M. echinocarpa* foram secos ao sol e, quando bem desidratados, triturados em liquidificador com nitrogênio líquido. A farinha obtida foi submetida a uma extração com NaCl 0,15 M na proporção 1:10 (p:v), durante 1 minuto com agitação constante e centrifugada a 7.000 x g a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante obtido foi dialisado contra água e concentrado por liofilização parcial.

O extrato concentrado foi dialisado com tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0 centrifugado e aplicado em coluna de DEAE-Sephacel, a eluição do pico não retido na coluna (PI-DEAE) apresentando atividade hemaglutinante foi realizada com o mesmo tampão (**FIGURA 6**). A amostra, proveniente desta cromatografia foi submetida a eletroforese.

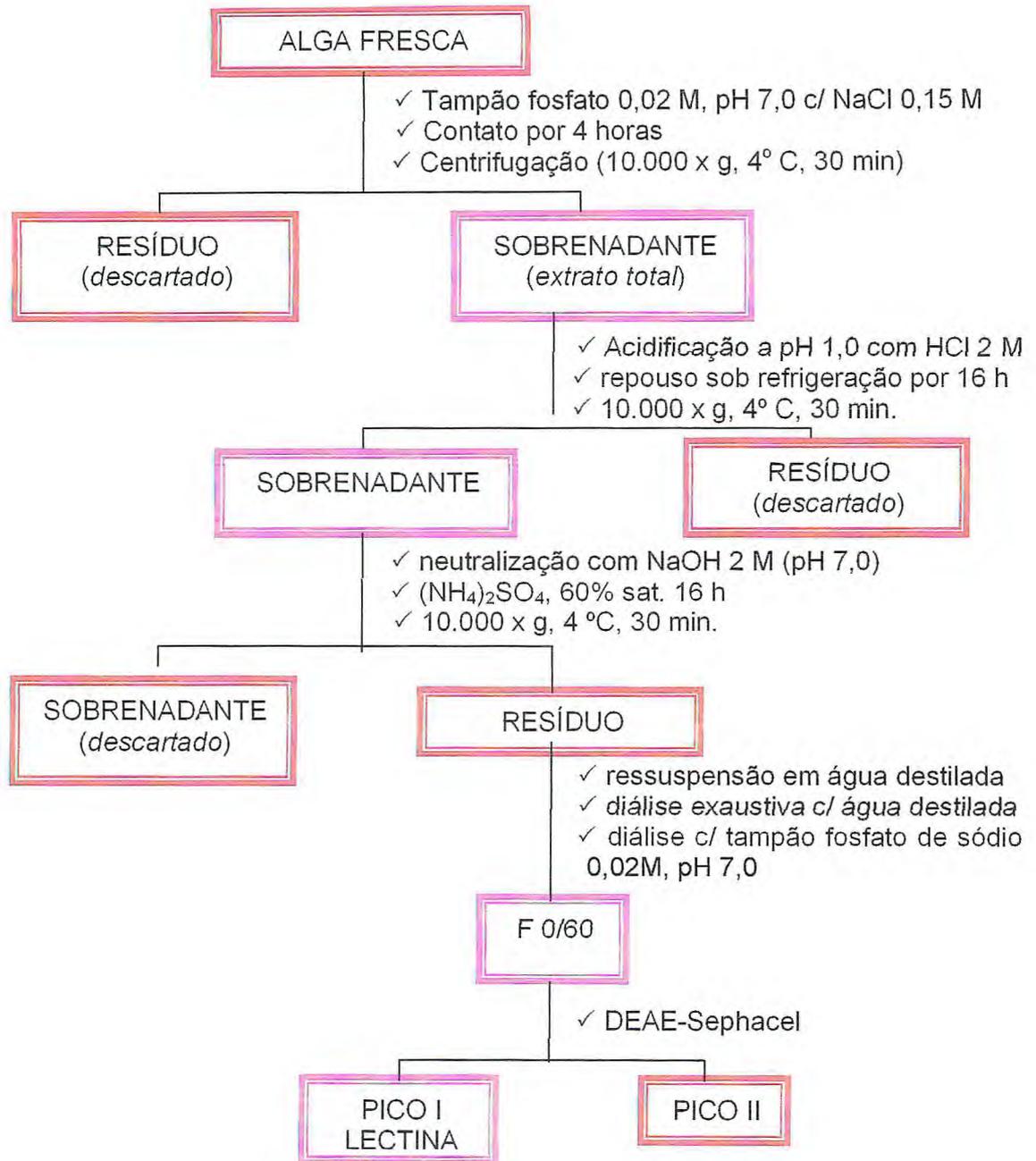


FIGURA 5: Esquema de extração e purificação da lectina presente na alga marinha *Bryothamnion triquetrum* (AINOUZ et al., 1995).

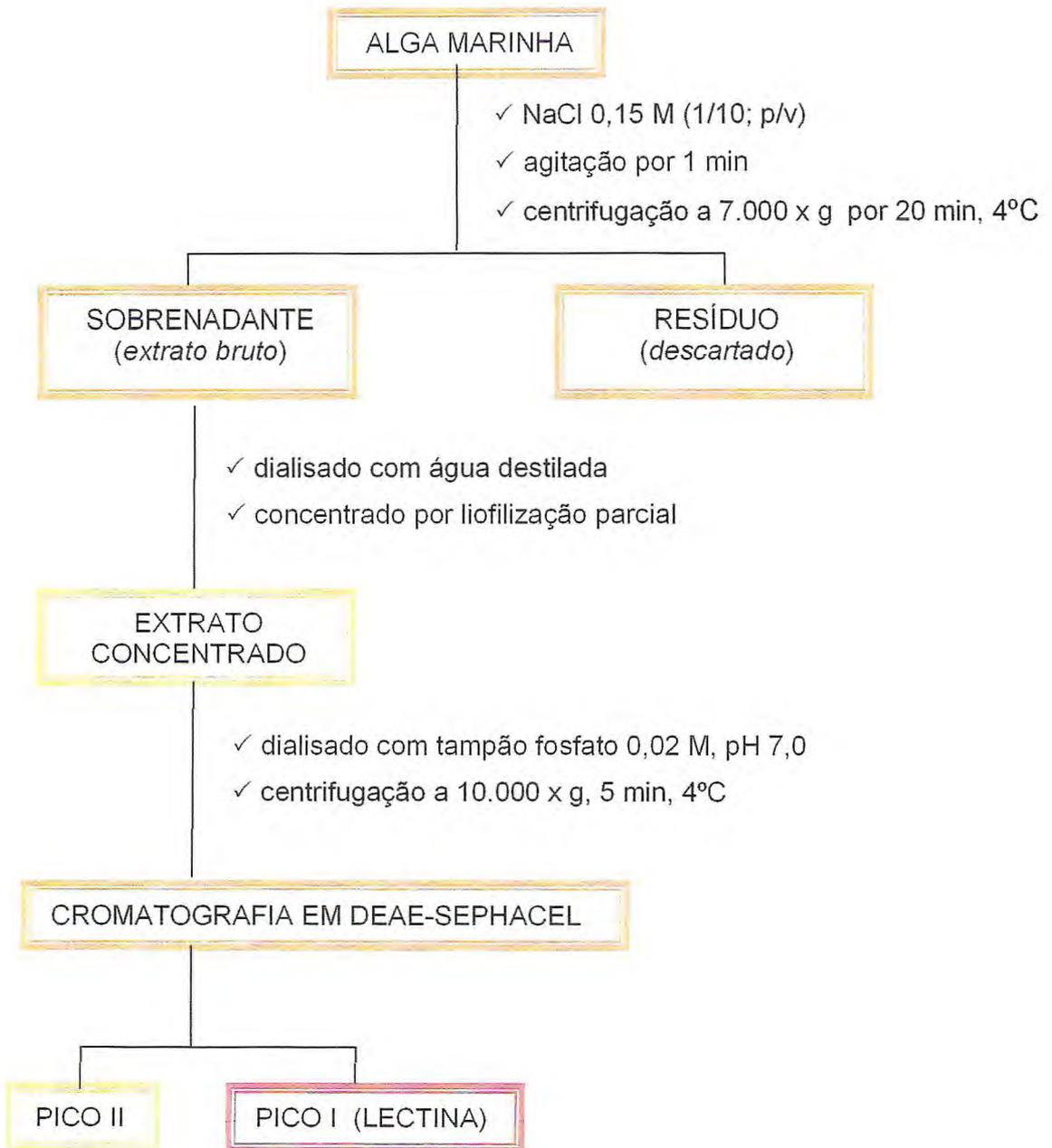


FIGURA 6: Esquema de extração da lectina presente na alga marinha vermelha *Meristiella echinocarpa* (FARIAS, 1995).

3.5. Determinação de proteína

As dosagens de proteínas solúveis foram realizadas segundo o método de BRADFORD (1976). As absorbâncias foram lidas num comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro Micronal modelo B 343 II. A concentração de proteína foi estimada com relação a uma curva padrão obtida com Albumina Sérica Bovina (BSA). A medida de absorbância a 280 nm também foi utilizada para determinação do teor de proteínas nos eluatos das colunas cromatográficas.

3.6. Determinação da atividade hemaglutinante

A atividade hemaglutinante foi determinada através de diluições seriadas em tubos de ensaio. Esta atividade foi realizada nas frações obtidas durante o processo de purificação das lectinas *A. multifida*, *B. triquetrum* e *M.echinocarpa*. Em cada tubo adicionou-se, inicialmente, 200 µl de NaCl 0,15 M e no primeiro tubo foram adicionados 200 µL da amostra e uma série de diluições duplas foram feitas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16...), homogeneizando-se completamente antes de cada transferência. A cada diluição foram adicionados 200 µL de uma suspensão de eritrócitos de coelho a 2% (no estado nativo ou tratada com enzimas proteolíticas, 0,1 mg/10 mL de sangue) e a interação, foi mantida a temperatura ambiente, por 60 minutos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados 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 corresponde ao inverso da maior diluição da amostra que ainda apresentou nítida aglutinação.

3.7. Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel

As frações 0/70 e 0/60 obtidas por precipitação por sulfato de amônio das algas *Amansia multifida* e *Bryothamnion triquetrum*, respectivamente, e o extrato concentrado da alga *Meristiella echinocarpa* foram submetidos à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel (**FIGURAS 7, 8 e 9**). As colunas foram montadas por gravidade e, em seguida, equilibradas com tampão fosfato 0,02M, pH 7,0. Posteriormente, as frações e o extrato concentrado foram aplicados nas colunas

e eluídos com o tampão de equilíbrio com um fluxo constante de 60 mL.h⁻¹ e coletadas frações de 3 mL e as absorbâncias determinadas a 280 nm (espectrofotômetro Pharmacia LKB-Ultrospec III) e determinada as atividades hemaglutinantes. Os picos contendo atividade hemaglutinante PI-DEAE (ativos e não pigmentados) foram dialisados contra água destilada, liofilizados e estocados para posterior utilização.

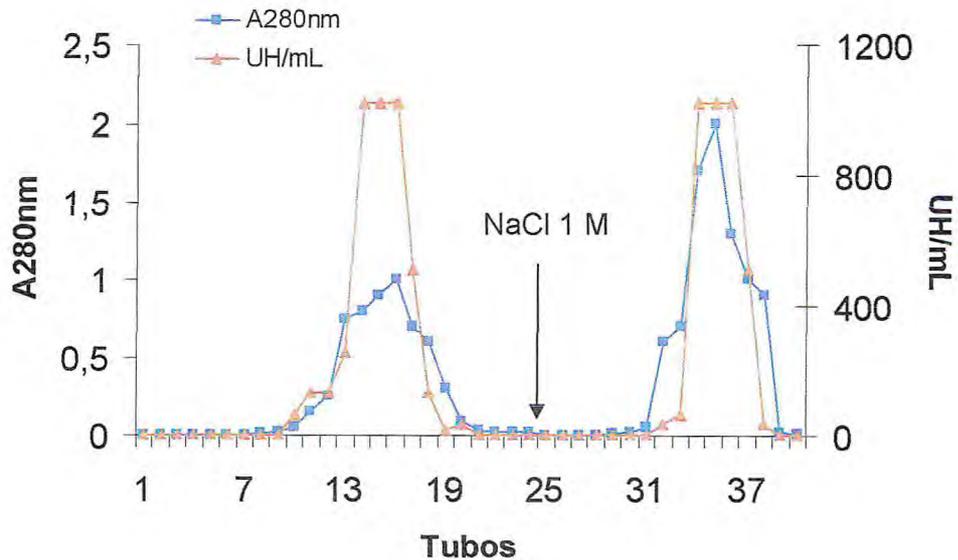


FIGURA 7: Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel da fração F (0/70) da alga *Amansia multifida*, equilibrada com tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0. O primeiro pico (PI) foi eluído com o tampão de equilíbrio e o segundo pico (PII) com NaCl 1 M. Fluxo constante de 60 mL/h e frações de 3 mL/tubo.

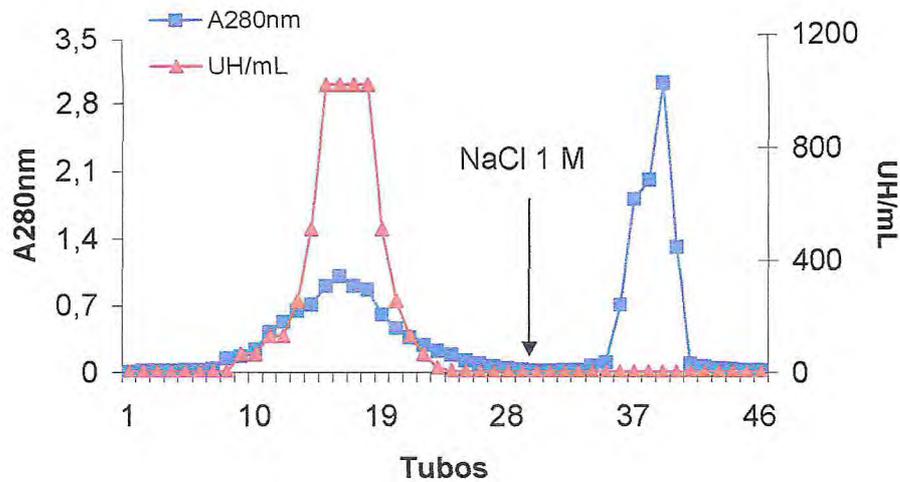


FIGURA 8: Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sephacel da fração F (0/60) da alga *Bryothamnion triquetrum*, equilibrada com tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0. O primeiro pico (PI) foi eluído com o tampão de equilíbrio e o segundo pico (PII) com NaCl 1 M. Fluxo constante de 60 mL/h e frações de 3 mL/tubo.

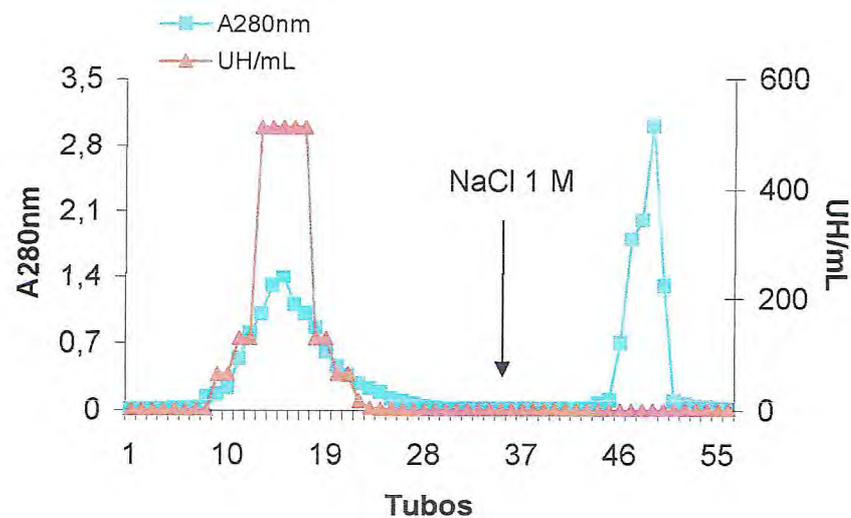


FIGURA 9: Cromatografia de troca iônica do extrato total concentrado da alga *Meristiella echinocarpa* em coluna de DEAE-Sephacel, equilibrada com tampão fosfato 0,02 M, pH 7,0. O primeiro pico (PI) foi eluído com o tampão de equilíbrio e o segundo pico (PII) com NaCl 1 M. Foi mantido um fluxo constante de 60 mL/h e coletadas frações de 3 mL/tubo.

3.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e β -Mercaptoetanol

A pureza das lectinas foram acompanhadas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e β -Mercaptoetanol, segundo o método descrito por LAEMMLI (1970), adaptado para o uso em placas de vidro. Para a montagem das placas, foi usado um gel de concentração (3,95% de poliacrilamida e 1% de SDS em tampão Tris-HCl 3,0 M, pH 6,8) e um gel de separação (12,5% de poliacrilamida e 1% de SDS em tampão Tris-HCl 3,0 M, pH 8,8). A amostra liofilizada foi dissolvida em tampão Tris-HCl 0,01 M, pH 8,8, contendo glicerol, SDS 1%, β -Mercaptoetanol e azul de bromofenol. Em seguida, as amostras foram incubadas a 100 °C por 5 minutos. Após a aplicação de alíquotas das amostras tratadas no gel, o material foi submetido a uma corrente constante de 40 mA, utilizando-se uma fonte regulável. O coramento das proteínas de *A. multifida* (**FIGURA 10**) e *M. echinocarpa* (**FIGURA 11**) foram feitas utilizando-se uma solução Coomassie Brilliant Blue R-250 a 0,25% em metanol, ácido acético e água (4,0:0,7:5,3; v/v/v) por um período de 18 horas. O descoramento foi realizado em uma solução de metanol; ácido acético e água (3,5:1,0:8,0; v/v/v). A banda protéica de *B. triquetrum* (**FIGURA 12**) foi revelada com nitrato de prata segundo a metodologia descrita por BLUM et al. (1987). Proteínas de massas moleculares conhecidas foram utilizadas como padrões: lactoalbumina, 14,2 kDa; inibidor de tripsina, 20,1 kDa; tripsinogênio, 24,0 kDa; anidrase carbônica, 29,0 kDa; gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 36,0 kDa; ovalbumina, 45, kDa e albumina sérica bovina, 66,0 kDa.



FIGURA 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %) na presença de SDS e β -mercaptoetanol de *A. multifida*. (1) marcadores de massa molecular: lactoalbumina, 14,2 kDa; inibidor de tripsina, 20,1 kDa; tripsinogênio 24,0 kDa; anidrase carbônica, 29,0 kDa; gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 36,0 kDa; ovoalbumina, 45,0 kDa e albumina sérica bovina, 66,0 kDa. (2) fração F0/70 e (3) PI-DEAE.



FIGURA 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e β -mercaptoetanol da lectina de *B. triquetrum*. (1) marcadores de massa molecular: lactoalbumina, 14,2 kDa; inibidor de tripsina, 20,1 kDa; tripsinogênio 24,0 kDa; anidrase carbônica, 29,0 kDa; gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 36,0 kDa; ovoalbumina, 45,0 kDa e albumina sérica bovina, 66,0 kDa. (2) lectina de *B. triquetrum*.

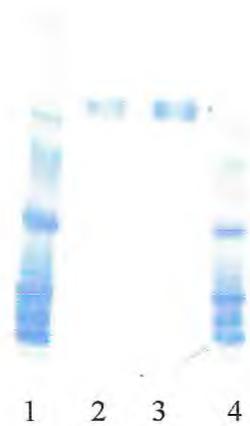


FIGURA 12: Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e β -mercaptoetanol de *M. echinocarpa*. (1) e (4) marcadores de massa molecular: lactoalbumina, 14,2 kDa; inibidor de tripsina, 20,1 kDa; tripsinogênio 24,0 kDa; anidrase carbônica, 29,0 kDa; gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 36,0 kDa; ovoalbumina, 45,0 kDa e albumina sérica bovina, 66,0 kDa. (2) e (3) lectina de *M. echinocarpa*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AINOUZ, I. L.; SAMPAIO, A. H.; FREITAS, A. L. P.; BENEVIDES, N. M. B., Mapurunga S. Comparative study on hemagglutinins from the red algal *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** **7 (1)**: 15-19, 1995.

AMBROSIO, A. L.; LIBIA, S.; SÁNCHEZ, E. I.; WOLFENSTEIN-TODEL, C.; CALVETE, J. J. Isolation of two novel mannan- and L-fucose-binding lectins from the green alga *Enteromorpha prolifera*: biochemical characterization of EPL-2. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **415**: 245-250, 2003.

AMICO, V. Marine brown algae of family Cystoseiraceae: chemistry and chemotaxonomy. **Phytochemistry**, **39 (6)**: 1257-1279, 1995.

AMIMI, A.; MOURADI, A.; GIVERNAUD, T.; CHIADMI, N.; LAHAYE, M. Structural analysis of *Gigartina pistillata* carrageenans (Gigartinaceae, Rhodophyta). **Carbohydrate Research**, **333**: 271-279, 2001.

ANDRADE, F. K. **Purificação e caracterização parcial da lectina presente na alga marinha verde *Cladophora vagabunda* (L.) Hoek**. Monografia de graduação em Ciências Biológicas. Departamento de Biologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004. 71 p.

ARMISEN, R. World-wide use and importance of *Gracilaria*. **Journal of Applied Phycology** **7**: 231-243, 1995.

BENEVIDES, N. M. B.; HOLANDA, M. L.; MELO, F. R.; PEREIRA, M. G.; MONTEIRO, A. C. O.; FREITAS, A. L. P. Purification and partial characterization of the lectin the marine *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh. **Botanica Marina**, **44**: 17-22, 2001.

BENEVIDES, N. M. B.; HOLANDA, M. L.; MELO, F. R.; FREITAS, A. L. P.; SAMPAIO, A. H. Purification and Partial Characterization of the Lectin from the Marine Red Alga *Enantiocladia duperreyi* (C. Agardh) Faalkenberg. **Botanica Marina**, **41**: 521-525, 1998.

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

BHATTACHARYA, D.; MEDLIN, L. Algal phylogeny and the Origin of Land Plants. **Plant Physiol.** **116**: 9-15, 1998.

BLANCK, H.; WALLIN, G.; WANGBERG, S. A. Species-dependent variation in algalsensitivity to chemical compounds. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** **8 (4)**: 339-351, 1984.

- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver-staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, **8**: 93-99, 1987.
- BOYD, W. C.; ALMODOVAR, L. R.; BOYD, L. G. Agglutinin in marine algae for human erythrocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, **6**: 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.** **722**: 248-254, 1976.
- CALVETE, J. J.; COSTA, F. H. F.; SAKER-SAMPAIO, A. H.; MURCIANO, M. P. M.; NAGANO, C. S.; CAVADA, B. S.; GRANGEIRO, T. B.; RAMOS, M. V.; BLOCH, Jr. C.; SILVEIRA, S. B.; FREITAS, B. T.; SAMAPAI, A. H. The amino acid sequence of the agglutinin isolated from the red marine alga *Brytohamnion triquetrum* defines a novel lectin structure. **Cellular and Molecular Life Sciences**, **57**: 343-350, 2000.
- CAMMUE, B. P. A.; PEETERS, B.; PEUMANS, W. J. A new lectin from Tulip (*Tulipa*) bulbs. **Plant**, **169**: 583-588, 1986.
- COSTA, F. H. F.; SAMPAIO, A. H.; NEVES, S. A.; ROCHA, M. L. A.; BENEVIDES, N. M. B.; FREITAS, A. L. P. Purification and partial characterization of a lectin from the red alga *Amansia multifida*. **Physiol. Mol. Biol. Plants**, **5**: 53-61, 1999.
- FARIAS, W. R. L. Purificação, caracterização parcial e atividade biológica da lectina da alga marinha vermelha *Meristiella echinocarpa* (Areschoug) Cheney et Gabrielson. **Dissertação de Mestrado em Bioquímica. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1995. 104 p.**
- FLEURENCE, J.; CATHERINE, L. C.; MABEOU, S.; MAURICE, M.; LANDREIN, A. Comparison of different extractive procedures for proteins from the edible seaweeds *Ulva rigida* and *Ulva rotundata*. **Journal Appl. Phycol.**, **7**: 577-583, 1995.
- GABIUS, H. J. & GABIUS, S. Glycoscience: status and perspectives, **Chapman & Hall, Weinheim, 1997.**
- GRIFFIN, R. L.; ROGERS, D. J.; SPENCER-PHILLIPS, P. T. N.; SWAIN, L. lectins from *Codium fragile* spp *tomentosoides* conjugated to colloidal gold: a new histochemical reagent. **Br. J. Biomed. Science**, v. **52**, p. 225-227, 1995.
- HIROISHI, S.; SUGIE, K.; YOSHIDA, T.; MORIMOTO, J.; TANIGUCHI, Y.; IMAI, S.; KUREBAYASHI, J. Antitumor effects of *Marginisporum crassissimum* (Rhodophyceae), a marine red alga. **Cancer Letters** **167**: 145-150, 2001.
- HOLANDA, M. L.; MELO, V. M. M.; SILVA, L. M. C. M.; AMORIM, R. C. N.; PEREIRA, M. G.; BENEVIDES, N. M. B. Differential activity of a lectin from *Solieria filiformis* against human pathogenic bacteria. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **38**: 1769-1773, 2005.

- HORI, K.; MIYAZAWA, K.; ITO, K. Some common properties of lectins from marine algae. **Hydrobiologia**, **204/205**: 561-566, 1990.
- HORI, K., MATSUBARA, K.; KEISUKE, M. Primary structures of two hemagglutinins from the marine red alga, *Hypnea japonica*. **Biochemica et Biophysica Acta** **1474**: 226-236, 2000.
- HORTA, P. A.; OLIVEIRA, E. C. **Citação e referência a documentos eletrônicos**. Disponível em: <http://www.ib.usp.br/algamare-br/> Acesso em 01 de fevereiro de 2004.
- KAWAKUBO, A.; MAKINO, H.; OHNISHI, J-I.; HIROHARA, H.; HORI, K. The marine red alga *Euclima serra* J. Agardh, a high yielding source of two isolectins. **Journal Appl. Phycology**, **9**: 331-338, 1997.
- KRAFT, G. T. Rhodophyta: morphology and classification. In: Lobban, C. S.; Wynne, M. J. **The Biology of seaweeds**, Berkeley: University of California, 1981.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage t₄. **Nature**, **227**: 680-685, 1970.
- LEITE, Y. F. M. M.; SILVA, L. M. C. M.; AMORIM, R. C. N. A.; FREIRE, E. A.; JORGE, D. M. M.; GRANGEIRO, T. B.; BENEVIDES, N. M. B. Purification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria ornata* and its effect on the development of the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, **1724**: 137-145, 2005.
- LIMA, M. E. P.; CARNEIRO, M. E.; NASCIMENTO, A. E.; GRANGEIRO, T. B.; HOLANDA, M. L.; AMORIM, R. C. N.; BENEVIDES, N. M. B. Identification of a lectin from the marine red alga *Gracilaria cornea* and its effects on the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, **53**: 6414-6419, 2005.
- LIMA, H. C.; COSTA, F. H. F.; SAMPAIO, A. H.; NEVES, S. A.; BENEVIDES, N. M. B.; TEIXEIRA, D. I. A.; ROGERS, D. J.; FREITAS, A. L. P. Induction and inhibition of human lymphocyte transformation by the lectin from the red marine alga *Amansia multiifida*. **Journal of Applied Phycology**, **10**: 153-162, 1998.
- LIS, H.; SHARON, N. Lectins in higher plants. In: STUMPF, P. K.; CONN, E. E., eds.: **The Biochemistry of Plants**, vol. 6, pp. 371-447. Academic Press Inc., New York, 1981.
- LIS, H.; SHARON, N. Lectin: carbohydrate specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v. 98, p. 637-674, 1998.
- LIU, J. N.; YOSHIDA, Y.; WANG, M. Q.; OKAI, Y.; YAMASHITA, U. Cell stimulation activity of seaweed extracts. **International Society for Immunopharmacology**, **19** (3): 135-142, 1997.

- MATUSUBARA, K.; SUMI, S.; HORI, K. Platelet aggregation is inhibited by phycolectins. **Experientia**, **52**: 540-543, 1996.
- MELO, F. R.; BENEVIDES, N. M. B.; PEREIRA, M. G.; HOLANDA, M. L.; MENDES, F. N. P.; OLIVEIRA, S. R. M.; FREITAS, A. L. P.; SILVA, L. M. C. M. Purification and partial characterization of a lectin from the red marine alga *Vidalia obtusiloba* C. Agardh. **Revista Brasileira Botânica**, **27** (2): 263-269, 2004.
- NAGANO, C. S.; MORENO, F. B. M. B.; BLOCH JR. C.; PRATES, M. V.; CALVETE, J. J.; SAKER-SAMAPIO, S.; FARIAS, W. R. L.; TAVARES, T. D.; NASCIMENTO, K. S.; GRANGEIRO, T. B.; CAVADA, B. S.; SAMPAIO, A. H. Purification and characterization of a new Lectin from the Red Marine Alga *Hypnea musciformis*. **Protein and Peptide Letters**, **9** (2): 159-165(7), 2002.
- NASCIMENTO, A. E. **Efeitos tóxicos de lectina e toxina da alga marinha *Solieria filiformis* sobre camundongos e *Boophilus microplus* (carrapatos)**. Tese de Doutorado em Bioquímica. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003. 110 p.
- NEVES, S. A.; BARUFFI-DIAS, M.; FREITAS, A. L. P.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Neutrophil migration induced *in vivo* and *in vitro* by marine algal lectins. **Inflammation research**, **50** (10): 486-490, 2001.
- NEVES, S. A. **Lectina de *Gracilaria caudata*: Isolamento, 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**. Dissertação de Mestrado em Bioquímica. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1999. 113 p.
- OLIVEIRA, S. R. M.; NASCIMENTO, A. E.; LIMA, M. E. P.; LEITE, Y. F. M. M.; BENEVIDES, N. M. B. Purification and characterization of a lectin from the red marine alga *Pterocladia capillacea* Santel & Hommers. **Revista Brasileira de Botânica** **25**: 397-403, 2002.
- PANORAMA DE AQUICULTURA. Algas marinhas: um recurso ainda pouco explorado pelo Brasil. **7** (41), 1997.
- PEREZ-LORENZO, S.; LEVY-BENSHIMOL, A.; GOMEZ-ACEVEDO, S. Presencia de lectinas, taninos e inibidores de proteases em algas marinhas de las costas venezolanas. **Acta Científica Venezolana**, **49**: 141-151, 1998.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, W. J. N. Proposal for a Novel Sistem of Nomeclature of Plant Lectins. **Lectins**, **10**: 105-117, 1995a.
- PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, W. J. N. Lectin as plant defense protein. **Plant Physiology**, **109**: 347-352, 1995b.
- RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHOM, S. E. **Biology of plants**, 5ª ed., Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 735 pp., 1996.

- ROGERS, D. J.; BLUNDEN, G.; EVANS, P. R. *Ptilota plumosa*, a new source of a blood group B specific lectin. **Med. Lab. Sciences**, **34**: 193-200, 1977.
- ROGERS, D. J.; BLUNDEN, G. Structural properties of the anti-b lectin from the red alga *Ptilota plumosa* (Huds.) C. Ag. **Bot. Marina**, **23**: 459-462, 1980.
- ROGERS, D. J.; FISH, B.; BARWELL, C. J. Isolation and properties of lectins from two red marine algae: *Plumaria elegans* and *Ptilota serrata*. In. INTERNATIONAL LECTIN MEETING, 10., 1990, Berlin/New York. **Proceedings of the 10th Lectin Meeting**. Berlin/New York: Walter de Gruyter, 7: 49-52, 1990.
- ROGERS, D. J.; HORI, K. Marine algal lectins: New developments. **Hydrobiologia** **260/261**: 589-261, 1993.
- ROGERS, D. J.; SWAIN, L.; CARPENTER, B. G.; CRITCHLEY, A. T. Binding of N-acetyl- α -D-galactosamine by lectins from species of green marine alga genus, *Codium*. **Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry**. **10**: 162-165, 1994.
- SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J.; SAKER-SAMPAIO, S.; NASCIMENTO, K. S.; NAGANO, C. S.; FARIAS, W. R. L. New affinity procedure for the isolation and further characterization of the blood group B specific lectin from the red marine alga *Ptilota plumosa*. **J. Appl. Phycology**, **14**: 489-496, 2002.
- SAMPAIO, A. H.; ROGERS, D. J.; BARWELL, C. J.; SAKER-SAMPAIO, S.; COSTA, F. H. F.; RAMOS, M. V. A new isolation and further characterization of the lectin from the red marine alga *Ptilota serrata*. **J. Appl. Phycology**, **10**: 539-546, 1999.
- SAMPAIO, A. H. **Hemaglutininas de algas marinhas do Nordeste Brasileiro e isolamento da hemaglutinina de *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux**. Dissertação de Mestrado em Bioquímica. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1992.
- SEKINE, H.; OHONUKI, N.; SADAMASU, K.; MONMA, K.; KUDOH, Y.; NAKAMURA, H.; OKADA, Y.; OKUYAMA, T. The Inhibitory Effect of the Crude Extract from a Seaweed of *Dygenea simplex* C. AGARDH on the in Vitro Cytopathic Activity of HIV-1 and It's Antigen Production. **Cem. Pharm. Bull.** **43 (9)**: 1580-1584, 1995.
- SHIOMI, K.; YAMANAKA, H.; KIKUCHI, T. Purification and physicochemical properties of a hemagglutinin (GVA-1) in the red alga *Gracilaria verrucosa*. **Bulletin of the Japanese Society Scientific Fisheries**, **47**: 1079-1084, 1981.
- SINGH, J.; SINGH, S.; KAMBOJ, S. S. A novel mitogenic and proliferative lectin from a wild cobra lily, *Arisaema avum*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **318**: 1057-1065, 2004.
- SMIT, J. A. Medical and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. **Journal of Applied Phycology**, v. **16**, p. 245-262, 2004.

TEIXEIRA, E. H. **Avaliação do potencial anticâncer de lectinas vegetais**. Tese de Doutorado em Bioquímica. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005. 106 p.

VAN DAMME, E. J.; BALZARINI, J.; SMEETS, K.; VAN LEUVEN, F.; PEUMANS, W. J. The monomeric and dimeric mannose-binding proteins from the Orchidaceae species *Listera ovata* and *Epipactis helleborine*: sequence homologies and differences in biological activities. **Glycocon J.** **11** (4): 231-332, 1994.

VAN DAMME, E. J.; PEUMANS, W. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related proteins, 17, ins with Diverse Biological Roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, **6**: 575-692, 1998.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**. **27**: 139-145, 2004.

**CAPÍTULO 2: USO DAS LECTINAS
NO DIAGNÓSTICO DE
DIABETES MELLITUS TIPO 1
E TIPO 2**

1. INTRODUÇÃO

1.1. Diabetes Mellitus

O conhecimento de Diabetes Mellitus (DM), já data de vários séculos. O papiro egípcio Ebers, em 1500 anos a.C., descreve uma doença caracterizada pela passagem de grande quantidade de urina. No entanto, o grande marco foi a descrição de Araterus da Capadócia, no século II, que denominou essa enfermidade de diabetes (correr através de sifão), com sua clássica descrição de que “a carne do corpo e dos membros se derretia e se convertia em urina” (KRALL et al., 1994). Apesar de várias descrições na China, Japão e Índia de que em certas pessoas ocorria poliúria com a urina doce e espessa, coube a Willis, em 1675, a observação da condição semelhante – doce e mel, estabelecendo o nome de diabetes mellitus (OLIVEIRA e MILECH, 2004).

1.1.1. Definição e importância do Diabetes Mellitus

O Diabetes Mellitus é considerado uma das principais síndromes de evolução crônica que acometem o homem moderno em qualquer idade, condição social e localização geográfica. É um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por níveis elevados de glicose no sangue (hiperglicemia) resultante de defeitos na secreção de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997).

Cerca de 15 milhões de pessoas, das quais 5 milhões não têm diagnósticos, são acometidas por diabetes mellitus. Nos estados Unidos, cerca de 650.000 novos casos de diabetes são diagnosticados por ano (Centers for Disease Control and Prevention, 1997). O diabetes é particularmente prevalente no idoso, com até 50% das pessoas com mais de 65 anos sofrendo algum grau de tolerância à glicose.

Caracteriza-se por hiperglicemia crônica com distúrbios do metabolismo dos carboidratos, lipídios, proteínas, água, vitaminas e minerais, e, durante a sua evolução, na dependência do controle metabólico obtido, podem advir complicações agudas e crônicas (OLIVEIRA e MILECH, 2004).

As conseqüências do DM, a longo prazo, incluem danos, disfunção e falência de vários órgãos, especialmente rins, olhos, nervos, coração e vasos sanguíneos. Com freqüência os sintomas clássicos (perda inexplicada de peso, polidipsia e poliúria) estão ausentes, porém poderá existir hiperglicemia de grau suficiente para causar alterações funcionais ou patológicas por um longo período antes que o diagnóstico seja estabelecido. Antes do surgimento da hiperglicemia, acompanhada de quadro clínico clássico do DM, a síndrome diabética passa por um estágio de distúrbio do metabolismo da glicose, caracterizado por valores glicêmicos situados entre a normalidade e a faixa diabética (World Health Organization, 1999).

O DM é um importante problema de saúde pública uma vez que é freqüente, e está associado a complicações originais que comprometem a produtividade, qualidade de vida e sobrevida dos indivíduos, além de envolver altos custos ao longo do tratamento. Medidas de prevenção do DM assim como das complicações são eficazes em reduzir o impacto desfavorável sobre morbimortalidade destes pacientes. Tal impacto pode ser avaliado através de dados obtidos de fontes do Ministério da Saúde (SILVESTRE, 1997), levantamentos regionais e de outras associações (SPICHLER et al., 1998):

- ✓ Diabetes mellitus como o diagnóstico primário de internação hospitalar aparece como a sexta causa mais freqüente e contribui de forma significativa (30% a 50%) para outras causas como cardiopatia isquêmica, insuficiência cardíaca, colecistopatias, acidente vascular cerebral e hipertensão arterial;
- ✓ Pacientes diabéticos representam cerca de 30% dos pacientes que internam em Unidades Coronarianas Intensivas com dor precordial;
- ✓ Diabetes é a principal causa de amputações de membros inferiores;
- ✓ É, também, a principal causa de cegueira adquirida;
- ✓ Cerca de 26% dos pacientes que ingressam em programas de diálise são diabéticos.

1.1.2. Classificação

A classificação atualmente recomendada (ALBERT e ZIMMET, 1998), apresentada no **Quadro 1**, incorpora o conceito de estágios clínicos do DM, desde a normalidade, passando para a tolerância à glicose diminuída e/ou glicemia de jejum alterada, até o DM propriamente dito.

Quadro 1: Classificação do Diabetes mellitus

TIPO 1: destruição da célula beta, geralmente ocasionando deficiência absoluta de insulina, de natureza auto-imune ou idiopática.
TIPO 2: varia de uma predominância de resistência à insulina com relativa deficiência de insulina, a um defeito predominantemente secretório, com ou sem resistência <i>insulínica</i> .
Outros tipos específicos
Defeitos genéticos funcionais da célula beta, defeitos genéticos na ação da insulina, doenças do pâncreas exócrino, endocrinopatias, induzidos por fármacos e agentes químicos, infecções, <i>formas incomuns de diabetes imuno-mediado</i> , outras síndromes genéticas geralmente associadas ao diabetes.
Diabetes gestacional

Diabetes mellitus tipo 1

O diabetes mellitus tipo 1 também chamado de diabetes juvenil, mas não é limitada a esses pacientes. A Insulina está ausente ou quase ausente nessa doença devido a células β no pâncreas defeituosas ou ausentes, que são destruídas por um processo auto-imune (LUPPI e TRUCCO, 1999). O diabetes tipo 1 caracteriza-se por hiperglicemia e hiperlipoproteinemia (quilomícrons e VLDL-lipoproteínas de baixa densidade), *episódios de severa cetoacidose, também causa anormalidades no metabolismo de gordura e proteína nesses pacientes.*

A hiperglicemia resulta, em parte, da incapacidade dos tecidos captarem glicose no plasma e, *por acelerada gluconeogênese hepática, a partir de aminoácidos derivados de proteína muscular.* A cetoacidose resulta de lipólise aumentada no tecido adiposo e de oxidação de ácidos graxos acelerada no fígado (KUKREJA e MACLAREN, 1999).

A **FIGURA 13** mostra as inter-relações metabólicas que existem no diabetes tipo 1. Como a produção defeituosa de insulina é realizada pelas células β , os níveis sanguíneos de insulina não aumentam em resposta a níveis elevados de glicose

sangüínea. Mesmo quando a glicose da dieta está sendo absorvida pelo intestino, a relação insulina/glucagon não pode aumentar e o fígado permanece gluconeogênico e cetogênico. Como é impossível mudar os processos de glicólise, glicogênese e lipogênese, o fígado não pode tamponar corretamente os níveis de glicose sangüínea (DEVLIN, 2002).

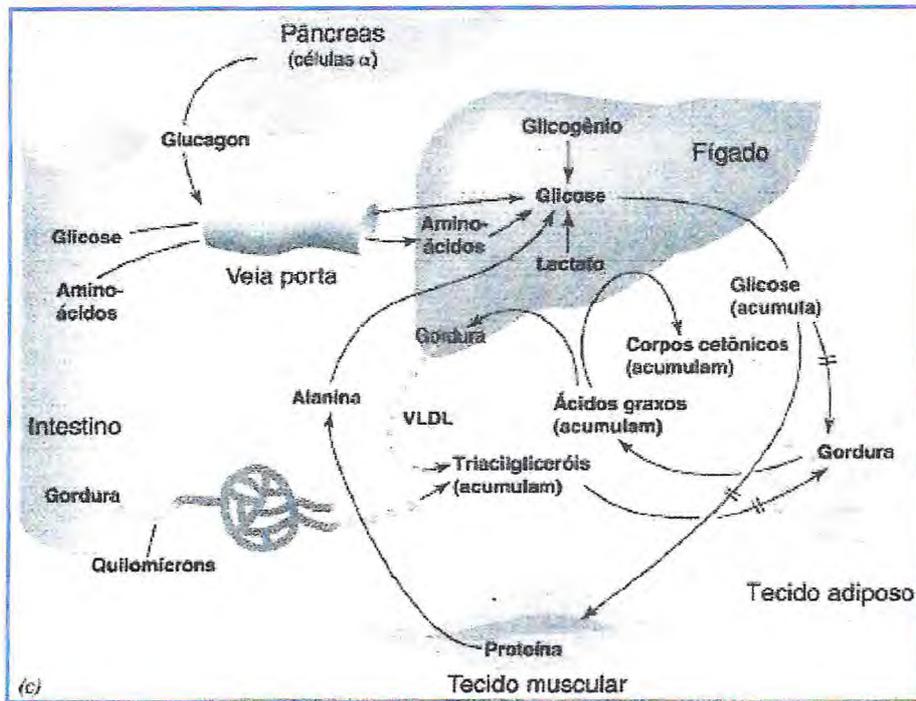


FIGURA 13: Inter-relações metabólicas no diabetes mellitus tipo 1 (DEVLIN, 2002).

Diabetes mellitus Tipo 2

O diabetes mellitus tipo 2 corresponde a 80-90 % dos casos diagnosticados de diabetes, o problema está na resistência à ação da insulina, juntamente com produção insuficiente de insulina pelas células β , para sobrepujar a resistência (DEVLIN, 2002). A cetoacidose raramente se desenvolve, talvez porque a insulina está presente para impedir a liberação descontrolada de ácidos graxos nos adipócitos. A gordura formada a partir de glicose, lactato, piruvato e aminoácidos é liberada do fígado na forma de VLDL, enquanto os triglicerídeos da dieta chegam à corrente sangüínea na forma de quilomícrons. Níveis elevados de VLDL são,

provavelmente, resultado da síntese hepática aumentada de triacilglicerol, estimulada por hiperglicemia e hiperinsulinemia.

A insulina está presente em formas normais a níveis elevados. Geralmente o DM 2 ocorre em pessoas obesas de meia-idade e idosas, sendo que a obesidade freqüentemente precede o desenvolvimento da doença, e parece ser o principal fator contribuinte (KANH e FLIER, 2000). A **FIGURA 14** mostra as inter-relações metabólicas características de uma pessoa com diabetes tipo 2.

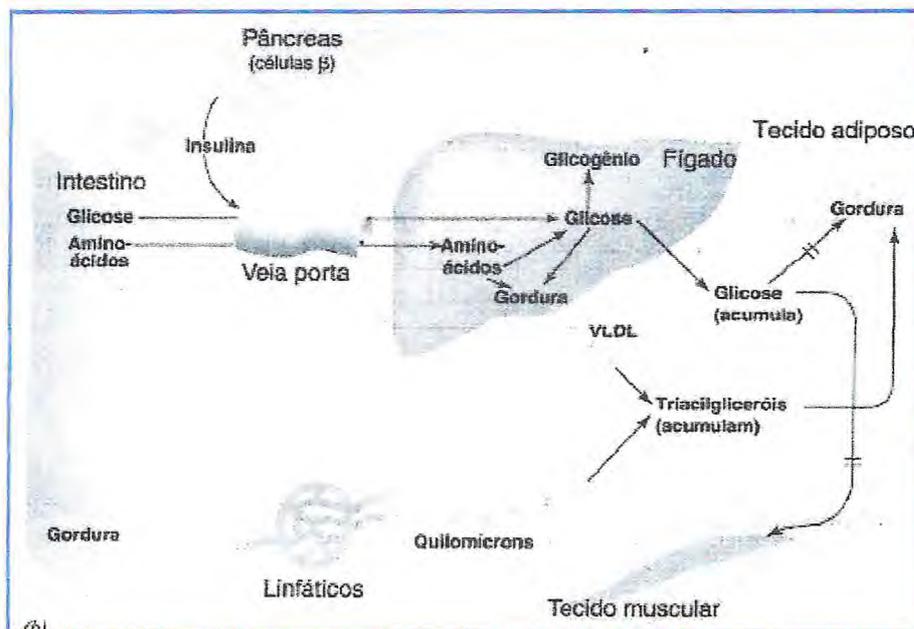


FIGURA 14: Inter-relações metabólicas no diabetes mellitus tipo 2 (DEVLIN, 2002).

Dados recentes implicam níveis aumentados de expressão do fator de necrose tumoral α (TNF- α *tumor necrosis factor- α*) e de uma nova proteína chamada resistina por adipócitos de indivíduos obesos, na causa da resistência. Quanto maior a massa de tecido adiposo, maior a produção de TNF- α e resistina, que atuam prejudicando o funcionamento do receptor de insulina e de eventos pós receptor. E, quanto maior o nível basal de insulina, menos receptores estão presentes na membrana plasmática (BAILEY et al., 2001).

1.2. Diagnóstico etiológico de referência e sua importância no Diabetes mellitus

No soro da maioria dos portadores da "stiff-man syndrome" detecta-se a presença de anticorpos contra uma enzima, a *decarboxilase do ácido glutâmico* (GAD). Esta enzima participa na biossíntese de um neurotransmissor inibidor, o ácido gama-aminobutírico (GABA). Esta enzima se concentra seletivamente em terminações nervosas GABA-érgicas e, fora do sistema nervoso central, nas células beta pancreáticas (SCHMIDLI et al., 2000). A enzima decarboxilase do ácido glutâmico foi identificada como sendo o auto-antígeno de peso molecular 64000 (64kDa) das células beta pancreáticas, que é considerado um dos mais importantes antígenos envolvidos na patogênese do DM tipo 1.

O ICA (anticorpo antiilhota) é realizado pela técnica da fluorescência indireta. ICA é um marcador de DM tipo 1; uma vez que a doença é autoimune, a presença deste anticorpo é sinal da atividade da doença. O grande problema deste ensaio é a necessidade de padronização, que foi feita em unidades JDF (Juvenil Diabetes Foundation) utilizando para isso soros padrões que são distribuídos e divulgados em "Workshops". Nesses mesmos "Workshops" foi mostrado que outras técnicas, como ELISA, não têm sensibilidade e especificidade, logo, não devem ser usadas. O ICA está positivo em 80% dos DM tipo 1 com < 5 anos, porém a sua sensibilidade cai após 5 anos do diagnóstico. Os indivíduos com DM tipo 2 apresentam 20% de positividade, sendo que se sabe que 20% do Dm tipo 2 necessitam de insulinização e 20% são magros, o que sugere que sejam DM tipo 1. A população geral apresenta 1 a 3% de positividade (OLIVEIRA e MILECH, 2004).

Anticorpo Anti-Insulina ou IAA (Anti-Insulin Auto-Antibody) pode ocorrer de forma espontânea ou após uso de insulina. Nestes casos os ensaios de laboratório podem ajudar. O radioimunoensaio é mais importante para o diagnóstico precoce de DM tipo 1 (auto-anticorpos) e o ELISA é o mais importante método para avaliar os anticorpos produzidos contra a insulina exógena (insulina aplicada pelo paciente). Nesse caso, os anticorpos podem se ligar à insulina não permitindo sua ação, com isso, piorando o controle metabólico do diabetes. Nos Laboratórios, quando há suspeita de resistência à insulina por anticorpos contra a insulina administrada, normalmente o paciente vai estar usando de 1 a 2 unidades de insulina/Kg de peso, com deficiente controle glicêmico. Para resolver este problema basta trocar a insulina por formas mais purificadas. IAA apresentam uma positividade de quase

100% nos diabéticos com menos de 5 anos do diagnóstico, passando para 62% nos diabéticos com 5 a 15 anos de doença e 15% após 15 anos de diagnóstico (McDEVITT, 1999).

Os anticorpos ligados ao diabetes têm assumido uma importância muito grande recentemente nas seguintes situações:

- Diagnóstico de Diabetes Tipo 1
- Diagnóstico Precoce do Diabetes Tipo 1
- Em caso de dúvidas em relação ao diagnóstico: DM1 ou DM2?

→ Diagnóstico de Diabetes Tipo 1

Os auto-anticorpos são muito importantes no diagnóstico do diabetes, uma vez que outros tipos de diabetes têm sido classificados, como o MODY (*Maturity-Onset Diabetes of the Young*), o diabetes mitocondrial, o diabetes neonatal e outros defeitos genéticos que estão sendo estudados (defeito no gene do receptor do glucagon-Like, *defeito no gene da glicogênio sintetase, etc*). Devido a esta variedade de novas classificações para o diabetes, no diagnóstico do tipo 1 se faz necessário uma confirmação laboratorial. Neste caso, os auto-anticorpos são fundamentais para este diagnóstico (ATKINSON e LESLIE, 2001).

→ Diagnóstico Precoce do Diabetes Tipo 1

Os auto-anticorpos estão presentes alguns anos antes da manifestação do diabetes mellitus tipo I. O Anti-GAD65 e o IAA podem aparecer até 8 anos antes da manifestação da doença, sendo então importantes para o diagnóstico do diabetes autoimune. Neste caso, estão indicados para este estudo todos os parentes de 1º grau de um indivíduo com DM 1, ou seja, irmãos ou filhos desses diabéticos.

Vários estudos de prevenção do diabetes estão em andamento. Os mais importantes são:

⇒ DPT (Diabetes Prevention Trial)

O estudo consiste em administrar insulina nos casos com Diabetes autoimune (*sem manifestação*) para tentar diminuir a expressão antigênica na superfície da célula beta. Em vários indivíduos comprovou-se o bloqueio da manifestação da doença após 5 anos de uso da insulina.

⇒ NPT (Nicotinamida Prevention Trial)

Administração de nicotinamida para prevenir o DM 1.

⇒ Estudos com administração de GAD

Em vários estudos experimentais (em animais) está sendo testada a supressão do processo auto-imune com administração de GAD. Existem estudos com infusão de GAD intratímico e GAD oral, e tem-se obtido bons resultados.

⇒ Estudos com administração de insulina oral

Em estudos com animais de experimentação, a administração de insulina oral reduziu o aparecimento de diabetes ou diminuiu a gravidade da doença. Estão sendo feitos estudos para sua futura aplicação clínica.

⇒ Nos casos de dúvida em relação ao diagnóstico: DM 1 ou DM 2?

Para resolver este problema, os auto-anticorpos para DM 1 podem ser de grande valia. O resultado dos exames mostrando a presença dos anticorpos confirma o diagnóstico de DMI. Negativo, pode ser que os níveis de anticorpos estejam baixos e o processo auto-imune se desenvolveu lentamente. Neste caso, pode ser difícil a definição do diagnóstico. O anti-GAD tem conseguido resolver grande parte desses casos por ser mais sensível que o ICA e IAA. Estes casos de DM tipo II que são magros, usam insulina precocemente, manifestam o diabetes entre 30 e 40 anos podem ser o que se classifica hoje de LADA (Latent Autoimmune Diabetes Mellitus in Adults).

O presente trabalho, buscou verificar a aplicação biológica de componentes presentes nas algas marinhas vermelhas, visando a observação da atividade hemaglutinante dos eritrócitos de pacientes com diferentes tipos de diabetes, o que seria relevante pelas possibilidades de utilizações práticas, como a diferenciação entre as principais formas de DM: o tipo 1 e o tipo 2.

1.3. Eritrócitos e glico-hemoglobina

Uma hemácia normal é um disco bicôncavo, sua configuração lembra uma bola macia comprimida entre dois dedos. Tem um diâmetro de cerca de 8 μm , mas é uma célula tão flexível que é capaz de passar facilmente pelos capilares, cujo diâmetro pode ser tão pequeno quanto 2,8 μm . A membrana do eritrócito (**FIGURA 15**) é tão fina que os gases, como oxigênio e dióxido de oxigênio, podem facilmente passar por ela; a forma de um disco fornece uma grande superfície de área que facilita a absorção e a liberação das moléculas de oxigênio (SMELTZER e BARE, 2002).



FIGURA 15: Foto do eritrócito na circulação sangüínea (SMELTZER e BARE, 2002).

Os eritrócitos maduros consistem principalmente de hemoglobina, que contém ferro e compõe até 95 % da massa da célula. Essas células não têm núcleo e apresentam menos enzimas metabólicas do que a maioria das outras células. A presença de uma grande quantidade de hemoglobina torna o eritrócito capaz de realizar sua principal função: o transporte de oxigênio entre os pulmões e os tecidos. Ocasionalmente, a medula libera levemente formas imaturas de hemácias, na circulação, chamadas de reticulócitos. Isso ocorre como uma resposta normal à demanda aumentada de hemácias (no caso de sangramento) (VICHINSKY, 1997).

Quando a glicemia está elevada, as moléculas de glicose se fixam à hemoglobina nos eritrócitos. Quanto maior for o período de tempo que a quantidade de glicose no sangue permanece acima do normal, mais glicose irá se ligar ao eritrócito e maior será o nível de glico-hemoglobina. Esse complexo (a hemoglobina presa à glicose) é permanente e perdura pelo resto de vida da hemácia, aproximadamente 120 dias (SMELTZER e BARE, 2002).

Logo, a glico-hemoglobina é um exame de sangue que reflete os níveis glicêmicos médios durante um período de aproximadamente 2 a 3 meses.

1.4. Alterações na membrana plasmática do eritrócito humano no diabetes

A organização bioquímica assim como as propriedades dinâmicas das membranas de eritrócitos são consideravelmente alterados no caso de diabetes, resultando em uma fraca função celular (MAZZANTI et al., 1989.)

Estudos na membrana de eritrócitos humano mostrou uma variedade de estruturas, as quais dependem basicamente da sensibilidade da técnica utilizada para o estudo. Assim, observou-se que a estrutura da membrana plasmática de

eritrócitos de humanos saudáveis, que já foi bastante investigada graças à facilidade com que esta pode ser purificada de outros componentes celulares (DEVLIN, 2002), diferencia-se levemente dos eritrócitos de diabéticos, tendo em comum o número de principais proteínas como: espectrina, actina, anquirina, banda 3 e banda 4.1 (**FIGURA 16**). Estudos anteriores a esse relatado têm relatado a importância dos componentes de membrana e organização estrutural, para o funcionamento normal das células e tecidos.

Os eritrócitos de pessoas com DM apresentam algumas alterações, como: hiperpolarização, diminuição da deformabilidade e aumento da microviscosidade, mudança na composição lipídica, estresse oxidativo e aumento da glicosilação não-enzimática (BALDINI et al., 1989; BÜHLER et al., 2001; WACZULÍKOVÁ et al., 2002; SAILAJA et al., 2003).

Com o estresse oxidativo ocorre a formação de radicais livres. A presença destes radicais causa dano endotelial, com lesão micro e macroangiopática. Essas alterações são responsáveis pela oxidação de lipoproteínas e pela glicosilação não-enzimática. A hiperglicemia está relacionada com o estresse oxidativo e é responsável pelo aumento de óxido nítrico e superóxido pelo endotélio. Essas substâncias reagem entre si para a formação de peroxinitrito, que modifica as lipoproteínas e lesa o endotélio (OLIVEIRA e MILECH, 2004).

A glicosilação não-enzimática de proteínas é o principal mecanismo patogênico, acarretando produtos avançados, estáveis, de proteínas glicosiladas (*advanced glycation endproducts* – AGEs). O acúmulo desses produtos, pela sua capacidade de alterar as propriedades físico-químicas das proteínas, incluindo-se aí enzimas e membranas de eritrócitos, altera os mecanismos de indução de sinalização celular, ativando fatores de transcrição e a consequente expressão de genes (OLIVEIRA e MILECH, 2004; BONNEFONT-ROUSSELOT, 2002).

Por outro lado, a glicosilação de proteínas resulta na formação de glicoproteínas e glicolipídeos. A superfície celular com esses carboidratos complexos resulta em um papel muito importante nas funções biológicas (SAILAJA et al., 2004).

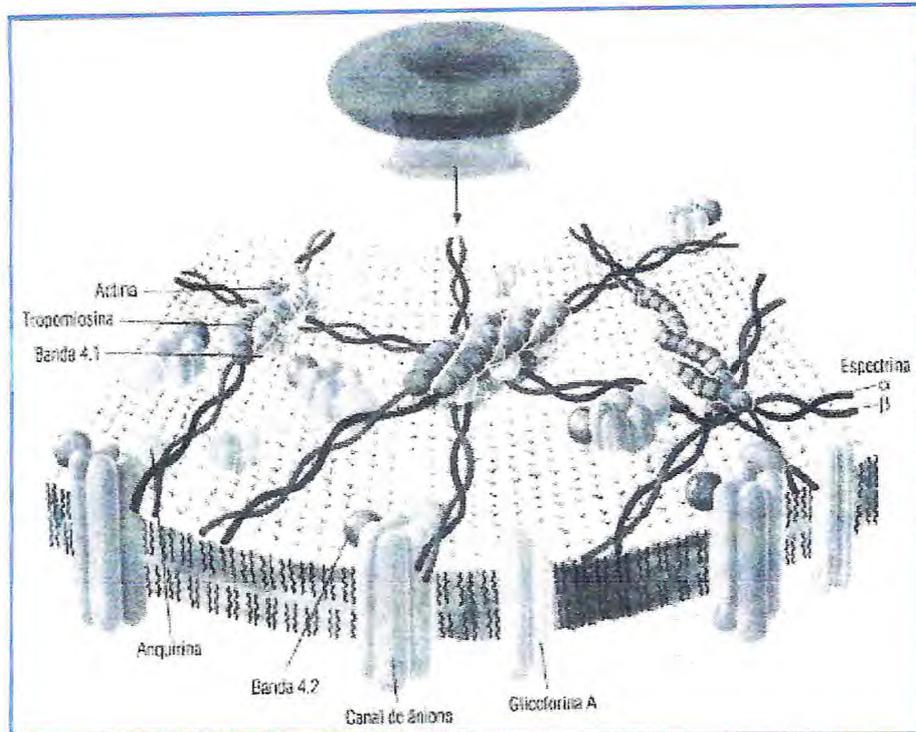


FIGURA 16: Diagrama esquemático da membrana do eritrócito (DEVLIN, 2002).

Além disso, produtos avançados da oxidação das proteínas (AOPP) são formados durante o estresse oxidativo pela ação da cloramine (produzido pela deficiência de mieloperoxidase (MPO) neutrofílica) (ABOU-SEIF e YOUSSEF, 2004). Esses compostos acumulados nos sistemas biológicos trazem complicações em longo prazo em diabéticos, causando danos às membranas biológicas e endotélio (GILLERY, 2001; NGUYEN et al., 2006).

A **FIGURA 17** mostra a formação de AGEs no qual, um grupo aldeído do açúcar forma uma base de Schiff com o grupo amino NH_2 -terminal, que depois se arranja numa ligação amino cetona mais estável, por uma reação espontânea (não-enzimática) conhecida como arranjo de Amadori (STITT, 2003). Essa glicosilação ocorre preferencialmente com os aminoácidos lisina e arginina.

KALOUSOVA et al (2002) observaram um aumento na produção de AGEs somente em diabetes tipo 2, mas AOPP apresentou níveis bastante elevados em diabetes tipo 1 e tipo 2.

A diminuição das atividades das enzimas superóxido dismutase, catalase, peroxidase, ceruloplasmin, glutathiona peroxidase, e o aumento na concentração de

glutathiona disulfide causaram alterações em eritrócitos de pacientes diabéticos e em tecidos de animais diabéticos (ABOU-SEIF e YOUSSEF, 2001).

ABOU-SEIF e YOUSSEF (2004) estudaram como os níveis dos íons metais (Cu^{+2} , Zn^{+2} , Mg^{+2} e Ca^{+2}), óxido nítrico, antioxidantes, formação de AGEs e AOPP, perfil lipídico e a atividade da amilase, poderiam causar danos nos eritrócitos dos dois tipos de diabetes. Eles concluíram que: os níveis de zinco e cálcio diminuiriam, em decorrência da eliminação desses pela urina; o aumento de cálcio pode ser atribuído a hiperglicemia que pode estimular a glicosilação (causada pela elevação de íons cobre, que acelera o estresse oxidativo, formando AGEs) e o aumento de AOPP devido à formação de espécies de oxigênio reativas.

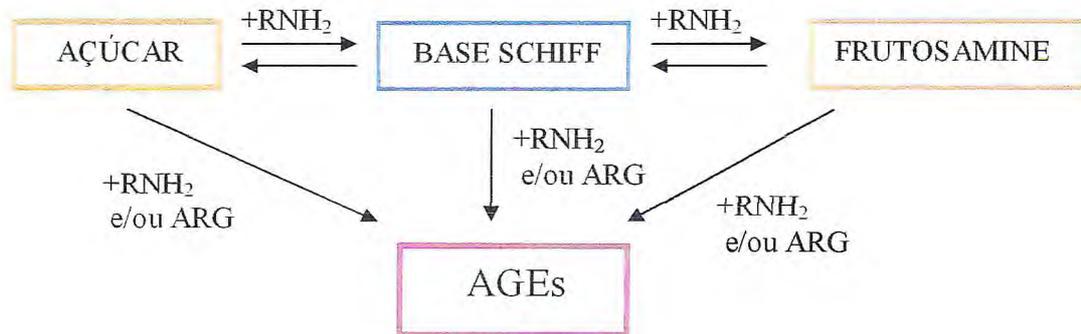


FIGURA 17: Formação de produtos avançados de proteínas glicosiladas (AGEs) (STITT, 2003).

1.5. Atividade hemaglutinante e diabetes

Várias funções têm sido aplicadas as lectinas, como: toxicidade, proteção contra patógenos e insetos, mitogenicidade, proteínas de reserva, reguladoras de crescimento, transporte e armazenamento de carboidratos ou reconhecimento celular (ETZLER, 1985; LIS e SHARON, 1981; PUSZTAI, 1991).

Os processos de reconhecimento de macromoléculas são comuns nas células, e especificidade é sua característica mais importante, que envolve processos como, fertilização, migração, coagulação e aglutinação (SMIT, 2004; AMBROSIO et al., 2003).

Lectinas (hemaglutininas) de algas marinhas são, normalmente, glicoproteínas com habilidade para aglutinar células vermelhas do sangue (BOYD e REGUERA, 1949). Vários polissacarídeos estão presentes na superfície das células, e como resultado muitas células, incluindo micróbios e levedura (PATCHETT et al., 1991; BIRD et al., 1992; CISAR et al., 1995), células tumorais (HORI et al., 1986) e eritrócitos, são seletivamente aglutinados por lectinas (AINOUZ e SAMPAIO, 1991; AINOZ et al., 1992; CHEN et al., 1995). Logo, a aglutinação é resultado da interação entre o açúcar de superfície e o sítio de ligação na molécula de lectina. Estas interações são normalmente não covalente, envolvendo pontes de hidrogênio, força de van der Waals e interações hidrofóbicas (MIRELMAN et al., 1986).

Lectinas, com propriedades hemaglutinante, ocorrem em uma variedade de algas pardas, verdes e vermelhas (ROGERS e HORI, 1993; BENEVIDES et al., 1998; SHANMUGAN et al., 2002). Elas aglutinam uma variedade de eritrócitos incluindo sangue de coelho, galinha, porco, cabra e do sistema humano ABO.

AINOUZ e SAMPAIO (1991) realizaram no Brasil, o primeiro levantamento da presença de atividade hemaglutinante em diferentes espécies de algas brasileiras. Das espécies testadas, 65% foram capazes de aglutinar pelo menos um tipo dentre os eritrócitos de humanos e de outros animais tratados com tripsina.

Posteriormente, novos trabalhos relatando a presença de atividade hemaglutinante em algas marinhas foram publicados evidenciando a presença de lectinas em diversas espécies testadas. Tais levantamentos propiciaram um desenvolvimento no estudo de lectinas em algas marinhas, muitas das quais no Nordeste brasileiro, permitindo o isolamento e caracterização de várias dessas moléculas (AINOUZ et al., 1992; AINOZ et al., 1995; FREITAS et al., 1997).

Vários trabalhos têm estudado a estrutura e função biológica das membranas celulares e, têm relatado que os diversos componentes de membrana dependem do tecido em estudo. A concentração das proteínas de membrana têm demonstrado estar intimamente relacionada com a sua função (ZUBAY et al., 1995).

A estrutura da membrana plasmática do eritrócito humano representa as interações de algumas das proteínas dessa membrana. ADEWOYE et al. (2001) comparando os componentes protéicos da membrana dos eritrócitos de Nigerianos diabéticos e nigerianos normais, observaram fortes evidências da grande alteração quantitativa e qualitativa das proteínas de membrana dos eritrócitos de Nigerianos

diabéticos. Isto pode provavelmente ter sérias implicações funcionais nos pacientes diabéticos.

NAGDA e DESHMUKH (1998) descreveram alterações na superfície dos eritrócitos durante o diabetes, como refletido pelos títulos de hemaglutinação contra uma lectina específica por galactose do látex de *Pedilanthus tithymaloides*. Essa hemaglutinação durante a condição diabética, se deve ao fato dos eritrócitos sofrerem um conjunto de mudanças em sua superfície, sob a influência de várias forças de glicosilação, onde os glicoconjugados de superfície são alterados, mascarados e/ou removidos.

Existem poucos trabalhos na literatura sobre as alterações na membrana de eritrócitos relacionados com hemaglutinação, principalmente utilizando lectinas de algas marinhas, por isso a relevância do trabalho em utilizar essas lectinas como diagnóstico de diabetes tipo 1 e tipo 2, devido à falta de marcadores com especificidade elevada para diferenciar DM 1 e 2.

2. OBJETIVOS

✓ Comparar o padrão de hemaglutinação das lectinas das algas *A. multifida*, *B. triquetrum* e *M. echinocarpa*, em eritrócitos de pacientes com Diabetes mellitus do tipo 1, tipo 2 e de voluntários sadios euglicêmicos.

✓ Avaliar a influência dos açúcares específicos das lectinas sobre o referido efeito biológico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Lectinas

As lectinas das algas *Amansia multifida*, *Bryothamnion triquetrum* e *Meristiella echinocarpa* foram isoladas de acordo com as metodologias descritas nos itens 3.5.1., 3.5.2. e 3.5.3. do capítulo 1, respectivamente.

3.2. Eritrócitos

→ Pacientes diabéticos

No ambulatório de Endocrinologia, do Hospital Universitário Walter Cantídio, da Universidade Federal do Ceará foram coletadas todas as manhãs, amostras de sangue dos pacientes diabéticos: 105 pacientes tipo 1 (79 mulheres e 26 homens); 31 tipo 2 (18 mulheres e 13 homens) para a determinação da propriedade de aglutinação de eritrócitos e da glico-hemoglobina.

→ Voluntários saudáveis euglicêmicos (Grupo controle)

No Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE) foram obtidos os sangues de 56 voluntários saudáveis euglicêmicos (11 mulheres e 45 homens).

Todos os participantes voluntários euglicêmicos responderam um questionário sobre alguns dados (**QUADRO 2**), sendo o diagnóstico de diabetes excluído através da realização de glicemia capilar aleatória, utilizando-se como limite de normalidade uma glicemia de jejum < 100 mg/dl e pós-prandial < 140 mg/dl.

Os eritrócitos humanos foram lavados 3 vezes com PBS, após determinação do hematócrito foi preparada uma suspensão a 2%.

Nesta pesquisa foram respeitados os preceitos éticos e legais a serem seguidos nas investigações envolvendo seres humanos, conforme preconiza a Resolução 196/1996, do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 1996). Para tanto, o trabalho em pauta foi apreciado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Walter Cantídio. Foram comprometidos o máximo de benefícios, garantindo que danos possíveis serão evitados e que haverá um retorno benéfico através do presente estudo.

3.3. Reagentes

Avidina - (Sigma, U.S.A.); Fetuína – (Sigma, U.S.A.); Manana - (Sigma, U.S.A.); *Tripsina* – (Sigma, U.S.A.).

- Os demais reagentes foram de grau analítico e, obtidos comercialmente.

Quadro 2: Formulário utilizado na coleta de sangue.

FORMULÁRIO
NOME: _____
DN: ____/____/____ SEXO: _____
PESO: _____ ALTURA: _____ IMC: _____
HISTÓRICO FAMILIAR: SIM () NÃO ()
HÁBITOS: () FUMO () ÁLCOOL
GLICEMIA CAPILAR: _____

3.4. Determinação da atividade hemaglutinante

Os ensaios de atividade hemaglutinante foram feitos através de diluições seriadas em tubos de ensaio. Esta atividade foi realizada no padrão de hemaglutinação das lectinas de *A. multifida*, *B. triquetrum* e *M. echinocarpa* com sangue de pacientes com diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2, conforme o item 3.6. do capítulo 1.

3.5. Ensaio de inibição da atividade hemaglutinante

O ensaio de inibição foi realizado na expectativa de confirmar se as glicoproteínas avidina, fetuína e manana de levedura inibiam a ação das lectinas em aglutinarem os eritrócitos dos pacientes diabéticos.

Nos ensaios preliminares de inibição da atividade hemaglutinante, alíquotas de 200 µL das amostras (lectinas de BT, AM e ME) foram pipetadas em tubos de ensaios contendo igual volume de soluções diluídas em séries (1/2, 1/4, 1/8,...) das soluções estoques das glicoproteínas avidina, fetuína e manana respectivamente,

encerando 5 mg/mL. Os tubos de hemaglutinação permaneceram 60 minutos à temperatura ambiente, e após este período foram adicionados 400 µL de uma suspensão a 2 % de eritrócitos dos pacientes diabéticos tipo 1 e tipo 2, deixados em repouso por 60 minutos a temperatura ambiente e, finalmente, centrifugados a 2000 x g por 30 segundos. A especificidade da lectina foi determinada observando se as glicoproteínas foram capazes de inibir a atividade hemaglutinante e os resultados foram expressos com base na concentração mínima do composto que ainda foi capaz de causar inibição (CMI).

3.6. Determinação da glico-hemoglobina

Para a determinação da glico-hemoglobina (HbA1) foram utilizados os seguintes passos de acordo com o protocolo do Kit da Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratório Ltda. O valor de referência utilizado foi: não diabético ou diabéticos bem controlados variando entre 6.0 – 8.3%

A- Preparo do hemolisado

Em cada tubo de ensaio foi pipetado 500 µL do hemolisante e, em seguida, acrescentado 100 µL da amostra, quando os tubos foram agitados e deixados em repouso por 5 minutos à temperatura ambiente.

B- Separação da glico-hemoglobina (HbA1)

A resina trocadora de cátions que estava suspensa no tampão foi homogeneizada 10 vezes, junto a ela foi adicionado 100 µL do hemolisado. Logo depois, o separador foi inserido no tubo, posicionando-se 1 cm acima da resina (**FIGURA 18**).

A amostra foi homogeneizada por inversão durante 8 minutos contínuos, e após este período, deixada em repouso por 3 minutos. O separador foi empurrado contra a resina até o ponto em que compactada contra o fundo do tubo ofereceu resistência. A solução de HbA1 penetra na cânula plástica (**FIGURA 19**).

C- Cálculo da hemoglobina total (HbT)

Em tubos de ensaios foram pipetados 5 mL de água destilada e em seguida, 20 μ L do hemolisado foi adicionado e homogeneizado.

D- Reconstituição do padrão

O produto liofilizado foi reconstituído com 500 μ L de água destilada e deixado em repouso por 30 minutos com ocasionais homogeneizações, até dissolução completa. Logo depois, o padrão foi tratado de maneira idêntica à amostra, como descrito nos itens A, B e C.

Cálculo do Fator (F)

$$\text{Fator (F)} = \frac{\text{absorbância HbT (padrão)}}{\text{Absorbância HbA1}} \times \% \text{ HbA1 (padrão)}$$

Cálculo da glico-hemoglobina da amostra

$$\% \text{ HbA1 (amostra)} = \frac{\text{absorbância HbA1}}{\text{absorbância HbT}} \times F$$

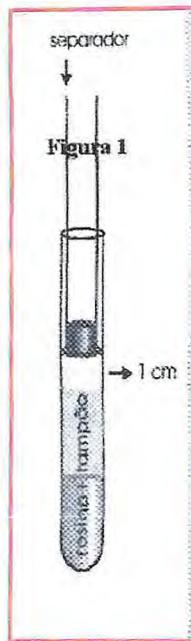


FIGURA 18: Introdução do separador no tubo, posicionando-se à 1 cm da superfície da resina.

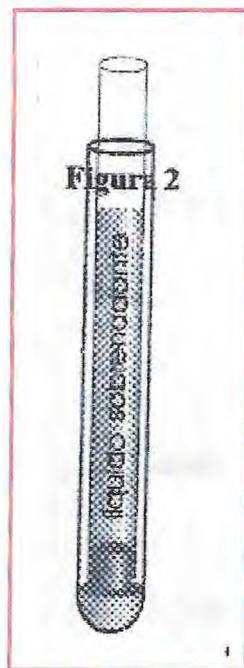


FIGURA 19: O separador é empurrado contra a resina até o ponto em que oferecer resistência.

3.7. Análise estatística

Inicialmente, os resultados obtidos foram empregados na criação de um arquivo geral contendo registros dos títulos de hemaglutinação das amostras de sangue de indivíduos pertencentes aos 3 grupos experimentais (normais, portadores de diabetes tipo 1, portadores de diabetes tipo 2) tratadas com as lectinas AM, BT e ME. Os dados foram avaliados quanto à normalidade da distribuição dos resíduos (testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov) e à homogeneidade de variância entre tratamentos (teste de Bartlett) utilizando-se o programa SAS(2000). Os dados relativos aos títulos de hemaglutinação mantiveram a heterogeneidade de variância, mesmo depois de várias tentativas de transformação (radicial, logarítmica e angular), tornando inadequada a realização de uma análise de variância (SAMPAIO, 2000). Foi executado, então, o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (SAS, 2000).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividade hemaglutinante e diabetes

Os pacientes diabéticos, do Serviço de Endocrinologia e Diabetes do Hospital Universitário Walter Cantídio, foram escolhidos ao acaso: 105 eram pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 2 (79 mulheres e 26 homens, idade média 51 anos, variando de 18-78 anos); 31 pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 1 (18 mulheres e 13 homens, idade média 29 anos) diagnosticados clinicamente.

As amostras de sangue dos voluntários saudáveis euglicêmicos, foram colhidas no HEMOCE no total de 56 (11 mulheres e 45 homens, idade média 30 anos, variando entre 21-49).

A **TABELA 2** mostra os títulos de hemaglutinação utilizando as lectinas das algas marinhas vermelhas: *A. multifida* (AM), *B. triquetrum* (BT) e *M. echinocarpa* (ME). Menores títulos foram observados com a lectina de BT ($3,45 \pm 0,89$). As lectinas de (AM) e (ME) apresentaram maiores valores de hemaglutinação frente aos eritrócitos de pacientes diabéticos tipo 2 (161,02 e 625,95), respectivamente.

Todas as lectinas testadas foram capazes de causar hemaglutinação dos eritrócitos dos pacientes com DM tipo 1 e DM tipo 2, o que não foi observado nos indivíduos euglicêmicos. Nos pacientes com DM1 os valores de hemaglutinação com a lectina da alga AM foram de $45,16 \pm 8,83$ UH/mL, com a BT de $6,52 \pm 1,78$ UH/mL e com ME de $80,64 \pm 22,58$ UH/mL, enquanto nos pacientes com DM2 foram de $161,01 \pm 45,62$ UH/mL; $3,45 \pm 0,89$ UH/mL e $652,95 \pm 130,41$ UH/ml, com as algas AM, BT e ME, respectivamente.

TABELA 2: Padrão de hemaglutinação das lectinas *A. multifida*, *B. triquetrum* e *M. echinocarpa* frente a eritrócitos de pacientes diabéticos.

Lectinas	Grupos	Número	Média	Desvio	Erro padrão da média	Significância
<i>Amansia multifida</i>	1	31	45,16	49,15	8,83	B
	2	105	161,01	50,44	45,62	A
	3	56	0,0	0,0	0,0	C
<i>Bryothamnion triquetrum</i>	1	31	6,52	9,93	1,78	A
	2	105	3,45	9,10	0,89	B
	3	56	0,0	0,0	0,0	C
<i>Meristiella echinocarpa</i>	1	31	80,64	125,73	22,58	B
	2	105	652,95	136,27	130,41	A
	3	56	0,0	0,0	0,0	C

1 – Diabetes tipo 1
 2 – Diabetes tipo 2
 3 – Grupo euglicêmico

No presente estudo, observou-se que AM aglutinou mais DM 2, enquanto BT aglutinou DM1 e, ME diferenciou bem DM 1 e DM 2.

NAGDA e DESHMUSKH (1998), descrevem a aglutinação dos eritrócitos de pacientes com diabetes tipo 1, tipo 2 e normais frente uma lectina galactose específica de *Pedilanthus tithymaloides*. Eles observaram uma redução significativa do título de hemaglutinação nos casos de diabetes tipo 1 quando comparados com os normais e diabetes tipo 2 não foi significativa. Os resultados da redução no título de hemaglutinação junto com a duração da condição diabética nos casos de tipo 1, são de valores prognósticos. As variações no título de hemaglutinação podem ser indicadores de alterações na superfície das células vermelhas do sangue.

A deficiência de insulina e mudanças secundárias em metabólitos e hormônios podem afetar a síntese macromolecular. Durante a hiperglicemia, proteínas na membrana celular são indubitavelmente sujeitos a glicosilação não-enzimática (MILLER et al., 1980; SAILAJA et al., 2004)).

Durante condições diabéticas, eritrócitos passam por mudanças complexas na sua superfície sob a influência de várias forças de glicosilação, glicoconjugados de superfície são alterados, mascarados e removidos (WATALA et al., 1992). Fragmentação de glicoconjugados sob a influência de radicais livres, onde açúcares reagem facilmente com radicais hidroxilas livres também levam a modificações na superfície celular, estes fatos talvez possam justificar os diferentes títulos de hemaglutinação.

No diabetes tipo 1 encontram-se vários fatores que parecem estar interligados, entre eles incluem-se a genética, os auto-anticorpos, os vírus e os radicais livres do oxigênio (www.diabetes.org.br – Acessado em 12/01/06).

A **TABELA 3** mostra a média da percentagem de glico-hemoglobina dos pacientes DM 1, DM 2 e dos voluntários euglicêmicos. Tais resultados sugerem que os diferentes títulos de hemaglutinação encontrados com as lectinas em estudo, não são devido a alterações metabólicas e sim alterações que ocorrem na membrana do eritrócito.

A hemaglutinação das lectinas estudadas demonstram distinguir o DM da normalidade visto que, as lectinas de algas não aglutinam hemácias de pacientes

TABELA 3: Glico-hemoglobina dos pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 1, tipo 2 e pacientes euglicêmicos.

	Grupos	Número	Média	Desvio	Erro padrão da média	Significância
Hemoglobina glicosilada (HbA1)	1	31	10,53	2,29	0,41	A
	2	105	6,18	4,22	0,50	B
	3	56	7,29	0,78	0,10	B

1 – Diabetes tipo 1
2 – Diabetes tipo 2
3 – Grupo
euglicêmico

Teste não paramétrico (Kruskal-Wallis)

normais. O padrão de hemaglutinação da lectina de ME mostrou-se adequado para discriminar o DM 1 do DM 2, o que possibilitará a utilização dessa lectina para fins diagnóstico no diabetes mellitus.

4.2. Inibição da atividade hemaglutinante e diabetes

A **TABELA 4** apresenta o ensaio de inibição da atividade hemaglutinante das lectinas das algas *A. multifida*, *B. triquetrum* e *M. echinocarpa* com os eritrócitos dos pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2.

As atividades hemaglutinantes das lectinas de AM, BT e ME são reconhecidamente inibidas por avidina, fetuína e manana, respectivamente (COSTA et al., 1999; AINOZ et al., 1995; FARIAS, 1995). Com isso realizamos ensaios de inibição da atividade hemaglutinante com sangue de pacientes diabéticos na presença dessas glicoproteínas. Como esperado, houve um bloqueio total do efeito da atividade hemaglutinante das lectinas de BT e ME, pelas glicoproteínas fetuína e manana, respectivamente, sugerindo que os sítios de ligação a carboidratos dessas lectinas são importantes para a atividade hemaglutinante no reconhecimento de pacientes diabéticos ou não.

Resultado interessante foi que a lectina de AM na presença da avidina (uma glicoproteína rica em resíduos de manose) não inibiu a atividade hemaglutinante com sangue de pacientes diabéticos. Esse dado não descarta a importância do sítio de ligação a carboidrato da lectina na identificação dos pacientes diabéticos, pois poderia estar havendo ligação com alguma proteína na membrana do eritrócito aos resíduos de manose da avidina.

Existem dados na literatura de uma proteína sérica, que possui alta afinidade a resíduos de manose ou a outros carboidratos componentes de bactérias, de vírus e de leveduras, denominada lectina ligante de manose (MBL) que tem uma importante função na imunidade (TURNER, 2003; KUIPERS et al., 2003).

TABELA 4: Inibição da atividade hemaglutinate das lectinas de *A. multifida*, *B. triquetrum* e *M. echinocarpa* por glicoproteínas.

Lectinas	Glicoproteína	Concentração C.M.A. ($\mu\text{g/mL}$)
<i>A. multifida</i>	Avidina	-
<i>B. triquetrum</i>	Fetuína	9,8
<i>M. echinocarpa</i>	Manana	9,8

5. CONCLUSÕES

- ✓ Este trabalho apresenta os primeiros resultados de demonstração de atividade hemaglutinante de lectinas de algas marinhas com eritrócitos de pacientes portadores de diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2, os diferenciando de indivíduos euglicêmicos.
- ✓ A lectina de *M. echinocarpa* mostrou-se a mais adequada para diferenciar o DM tipo 1 do DM tipo 2, sendo possivelmente um novo recurso diagnóstico para diferenciação dos dois tipos de diabetes.
- ✓ No ensaio de inibição as lectinas de BT e ME, foram inibidas com as glicoproteínas fetuina e manana, respectivamente, sugerindo que os sítios de ligação a carboidratos dessas lectinas são importantes para a atividade hemaglutinante no reconhecimento de pacientes diabéticos ou não.
- ✓ A lectina de AM na presença da avidina não inibiu a atividade hemaglutinante com sangue de pacientes diabéticos, sugerindo ocorrer ligação com alguma proteína na membrana do eritrócito aos resíduos de manose da avidina.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-SEIF, M. A.; YOUSSEF, A. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. **Clinica Chimica Acta**, **346**: 161-170, 2004.
- ABOU-SEIF, M. A.; YOUSSEF, A. Oxidative stress and male IGF-1, gonadotropin and related hormones in diabetic patients. **Clin. Chem. Lab. Med.**, **39 (7)**: 618-623, 2001.
- ADEWOYE, E. O., AKINLADE, K. S.; OLORUNSOGO, O. O. Erythrocyte membrane protein alteration in Diabetics. **East African Medical Journal**, **78(8)**: 438-440, 2001.
- AINOUZ, I. L.; SAMPAIO, A.H. Screening of Brazilian marine algae for hemagglutinins. **Botanica Marina** **34**: 211-214, 1991.
- AINOUZ, I. L.; SAMPAIO, A. H; BENEVIDES, N.M.B.; FREITAS, A.L.P.; COSTA, F.H.F.; CARVALHO, M.R.; PINHEIRO-JOVENTINO, F. Agglutination on enzyme treated erythrocytes by Brazilian marine algae extracts. **Botanica Marina** **35**: 475-479, 1992.
- AINOUZ, I. L.; SAMPAIO, A. H.; FREITAS, A. L. P. & BENEVIDES, N. M. B, Mapurunga S. Comparative study on hemagglutinins from the red algal *Bryothamnion seaforthii* and *Bryothamnion triquetrum*. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal** **7 (1)**: 15-19, 1995.
- ALBERTI, K. G. M. M.; ZIMMET, P. Z. Definition diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. **Diabetic Med** **15**: 539-553, 1998.
- AMBROSIO, A. L.; LIBIA, S.; SÁNCHEZ, E. I.; WOLFENSTEIN-TODEL, C.; CALVETE, J. J. Isolation of two novel mannan- and L-fucose-binding lectins from the green alga *Enteromorpha prolifera*: biochemical characterization of EPL-2. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, **415**: 245-250, 2003.
- ATKINSON-M.; LESLIE-DR. Inverse relation between humoral and cellular immunity to glutamic acid decarboxylase in subjects at risk of insulin-dependent diabetes. **J. Endocrinol. Invest.** Jul-Aug; **17(7)**: 581-4, 2001.
- BAILEY, S. T.; BHAT, S.; BROWN, E. J.; BANERJEE, R. R.; WRIGHT, C. M.; PATEL, H. R.; SHIMA, R. S.; LAZAR, M. A. The hormone resistin links obesity to diabetes. **Nature**, **409**: 307, 2001.
- BALDINI, P.; INCERPI, S.; LABERT-GARDINI, S.; SPINEDI, A.; LULY, P. Membrane lipid alteration and Na pumping activity in erythrocytes from IDDM and NIDDM subjects. **Diabetes**, **38**: 825-831, 1989.
- BENEVIDES, N. M. B; HOLANDA, M. L.; MELO, F. R.; FREITAS, A. L. P.; SAMPAIO, A. H. Purification and partial characterization of the lectin from the marine red alga *Enantiocladia duperreyi* (C. Agardh) Falkenberg. **Botanica Marina** **41**: 521-525, 1998.

- BIRD, K. T.; CHILES, T. C. LONGLEY, R. E.; KENDRICK, A. F. KINKEMA, M. D. Agglutinins from marine macroalga of the southeastern United States. **Journal Applied Phycol.** **5**: 213-218, 1992.
- BONNEFONT-ROUSSELOT, D. Glucose and reactive oxygen species. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, **5**: 561-568, 2002.
- BOYD, W. C.; REGUERA, R. M. Hemagglutinating substances in various plants. **Journal Immunol.** **62**: 333-339, 1949.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução 196/1996. Brasília, 1996.
- BÜHLER, I.; WALTER, R.; REINHART, W. H. Influence of D- and L-glucose on erythrocytes and blood viscosity. **European Journal of Clinical Investigation**, **31**: 79-85, 2001.
- Centers for Disease Control and Prevention (1997). National diabetes fact sheet: National estimates and general information on diabetes in the United States. Atlanta: U. S. Department of Health and Human Services. In: SMELTZER e BARE, 2002.
- CHEN, H.; SUN, P.; SONG, Q. Lectins, a powerful defensive weapon of aquatic animals. **J. Oceanogr. Huanghai Bohai Seas** **13**: 61-71, 1995.
- CISAR, J. O.; SANDBERG, A. L.; ABEYGUNAWARDANA, C.; REDDY, G. P.; BUSH, C. A. Lectin recognition of host-like saccharide motifs in streptococcal cell wall polysaccharides. **Glycobiol.** **5**: 655-662, 1995.
- DEVLIN, T. M. **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. 1 ed. São Paulo; Edgar Blücher Ltda., 2002. 1084 p.
- ETZLER, M. E. Plant lectins: molecular and biological aspects. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v. **36**, p. 209-234, 1985.
- FREITAS, A.L.P.; TEIXEIRA, D.I.A.; COSTA, F.H.F.; FARIAS, W.R.L.; LOBATO, A.S.C.; SAMPAIO, A.H.; BENEVIDES, N.M.B. A new survey of Brazilian marine algae for agglutinins. **Journal of Applied Phycology**, **9**: 495-501, 1997.
- GILLERY, P. Advanced glycation end products (AGEs), free radicals and diabetes. **J. Soc. Biol.** **194 (4)**: 387-390, 2001.
- HORI, K.; MIYAZAWA, K.; HASHIMOTO, K.; ITO, K. Hypnins, low-molecular weight peptidic agglutinins isolated from a marine red alga, *Hypnea japonica*. **Biochem. Biophys. Acta.** **873**: 228-236, 1986.
- KAHN, B. B.; FLIER, J. S. Obesity and insulin resistance. **Journal Clin. Invest.** **106**: 473, 2000.

- KALOUSOVA, M.; SKRHA, J.; ZIMA, T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. **Physiol. Res.** **51**: 597-604, 2002.
- KRAL, L. P.; LEVINE, R.; BARNET, D. The history of diabetes. In: **Joslin's diabetes mellitus**. Kahn, C. R. e Weir G. C. (eds.) Lea and Febiger, Philadelphia, 13 ed., pp. 1-81, 1994.
- KUKREJA, A.; MACLAREN, N. K. Autoimmunity in diabetes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** **84**: 4371, 1999.
- LIS, H.; SHARON, N. Lectins in higher plants. In: STUMPF, P. K. & CONN, E. E., eds.: **The Biochemistry of Plants**, vol. 6, pp. 371-447. Academic Press Inc., New York, 1981.
- LUPPI, P.; TRUCCO, M. Immunological models of type 1 diabetes. **Horm. Res.** **52**: 1, 1999.
- MAZZANTI, L., RABINI, R. A.; TESTA, I.; BERTOLI, E. Modifications induced by diabetes on the physicochemical and functional properties of erythrocyte plasma membrane. **Eur. J. Clin. Invest** **19**: 84-89, 1989.
- McDEVITT, H.O. Autoimmune diabetes and its antigenic triggers. **Hosp. Pract. Off. Ed.** Jul 15; 30(7): 55-62, 1999.
- MILLER, G. J.; KUNSMAN, J. E.; FIELD, R. A. Characteristics of soft subcutaneous fat in ram lambs fed corn and corn-silage diets. **J. Food Sci.** **45**: 279-285, 1980.
- MIRELMAN, D. In: **Microbial Lectins and Agglutinins: properties and Biological Activity**, pp. 443, **John Wiley and Sons**, New York, 1986. Citado por SINGH, R. S., 1999.
- NAGDA, K. K.; DESHMUKH, B. Hemagglutination pattern of galactose specific lectin from *Pedilanthus tithymaloides* in diabetes mellitus. **Indian Journal of Experimental Biology**, **36**: 426-428, 1998.
- NGUYEM, S.; PACARIU, M.; GHITESCU, L.; Early glycation products of endothelial plasma membrane proteins in experimental diabetes. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1762**: 94-102, 2006.
- OLIVEIRA, J. E. P. e MILECH, A. **Diabetes mellitus – Clínica, Diagnóstico e Tratamento Multidisciplinar**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. 362 p.
- PATCHETT, R. A.; KELLY, A. F.; KROLL, R. G. The adsorption of bacteria to immobilized lectins. **J. Appl. Bacteriol.** **71**: 277-284, 1991.
- PUZSTAI, A. **Plant lectins**. Cambridge, Cambridge University Press, 263 pp., 1991.
- ROGERS, D. J.; HORI, K. Marine algal lectins: New developments. **Hydrobiologia** **260/261**: 589-261, 1993.

- SAILAJA, Y. R.; BASKAR, R.; SARALAKUMARI, D. The antioxidant status during maturation of reticulocytes to erythrocytes in type 2 diabetics. **Free Radical Biology & Medicine**, **35**: (2): 133-139, 2003.
- SAILAJA, Y. R.; BASKAR, R.; SRINIVAS RAO, C. S.; SARALAKUMARI, D. Membrane lipids and protein-bound carbohydrates status during the maturation of reticulocytes to erythrocytes in type 2 diabetics. **Clinica Chimica Acta** **341**: 185-192, 2004.
- SCHMIDLI, R.S., COLMAN, P.G.; BONIFACIO, E. Disease sensitivity and specificity of 52 assays for glutamic acid decarboxylase antibodies. The Second International GADAB Workshop. **Diabetes**. Jun; 44(6): 636-40, 2000.
- SHANMUGAM, M.; MODY, K. H.; RAMAVAT, B. K.; MURTHY, A. S. K.; SIDDHANTA, A. K. Screening of Codiacean algae (Chlorophyta of the Indian coasts for blood anticoagulant activity. **Indian Ind. J. mar. Sci.** **31**: 33-38, 2002.
- SILVESTRE, J. A. Hospitalização SUS. Coordenadoria da Atenção à Saúde do Idoso. **Ministério da Saúde**, 1997.
- SINGH, R. S. TIWARY, A. K.; KENNEDY, J. F. Lectins: Sources, Activities and Applications. **Critical Reviews in Biotechninology**, **19** (2): 145-178, 1999.
- SMELTZER, S. C.; BARE, B. G. **Enfermagem médico-cirúrgica**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 1034 p.
- SMIT, J. A. Medical and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. **Journal of Applied Phycology**, **16**: 245-262, 2004.
- Sociedade Brasileira de Diabetes. Consenso Brasileiro sobre Diabetes 2002: diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito do tipo 2. – Rio de Janeiro: **Diagraphic**, 72p., 2003.
- SPILCHLER, E. R. S; SPILCHER, D.; MARTINS, C. S. F. Diabetic lower extremities amputation. Rio de Janeiro. **Diabetologia**, **41** (279): 90-96, 1998.
- STITT, A. W. The role of advanced glycation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. **Experimental and Molecular Pathology**, **75**: 95-108, 2003.
- The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. **Diabetes Care**, **20**: 1183-1197, 1997.
- VICHINSKY, E. P. Understanding the morbidity of sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, **99**: 974-982, 1997.
- WATALA, C.; WITAS, H.; OLSZOWSKA, L.; PIASECKI, W. The association between erythrocyte internal viscosity, protein non-enzymatic glycosylation na erythrocyte membrane dynamic properties in juvenile diabetes mellitus. **Int. J. Exp. Pathol** **73** (5): 655-663, 1992.

WACZULÍKOVÁ, I.; SIKUROVÁ, L.; CÁRSKY, J. Fluidity gradient of erythrocyte membranes in diabetics: the effect of resorcylic acid aminoguanidine. **Bioelectrochemistry**, **55**: 53-55, 2002.

World Health Organization Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus, 1999. In: Sociedade Brasileira de Diabetes, 2003.

ZUBAY, G. L., PARSON, W. W.; VANCE, D. E. **Biochemistry**, **1995**. WmC Brown Publishers Oxford, England: 154-155, 1995.

**CAPÍTULO 3: ATIVIDADES
ANTINOCICEPTIVA E
ANTIEDEMATOGÊNICA DA
LECTINA DE
*Meristiella echinocarpa***

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

Os antigos consideravam as doenças uma conseqüência da possessão demoníaca ou a ira dos Deuses. Assim, antigamente, o tratamento das doenças pelo emprego de produtos naturais foi invariavelmente acompanhado por rituais religiosos, acreditando serem essenciais para o processo de cura (www.farmacologia.com.br – Acessado em 09/12/05). Com os avanços da medicina moderna, os produtos obtidos de origem natural se tornaram importantes drogas terapêuticas (DE SMET, 1997; SHU, 1999).

Vários trabalhos têm sido publicados, apresentando compostos com atividades ou propriedades farmacológicas (bioativos) isolados de organismos marinhos: bactérias, invertebrados e algas (MAYER e LEHMANN, 2000; Mayer e Hammann, 2002; ANEIROS e GARATEIX, 2004). Algumas espécies de algas pertencentes aos gêneros *Codium*, *Sargassum*, *Gracilaria* e *Hypnea*, são usadas na medicina popular (LIM et al., 2002).

Segundo Ireland et al. (1993), cerca de 35% de novos compostos químicos são obtidos de algas, seguido pelas esponjas (29 %) e cnidários (22 %). Desde 1995, houve um incremento no número de novos produtos descobertos a partir de algas. Atualmente cresce a busca de novas moléculas em microrganismos marinhos (KELECOM, 2002).

Apesar do processo ocorrido na busca de compostos farmacológicos, a medicina necessita de analgésicos potentes e efetivos para amenizar a dor, sem efeitos colaterais fortes, como a morfina (SHU, 1999; CALIXTO et al., 2000).

A dor foi definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor como sendo “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão” (LOESER e MELZACK, 1999; MERSKEY e BOGDUK, 1994). Entretanto, sua percepção é complexa e não envolve apenas a transdução de um estímulo nocivo, mas também processos emocionais e cognitivos em nosso cérebro (JULIUS e BASBAUM, 2001). É uma experiência subjetiva difícil de definir de modo exato, mesmo se pensando que todos sabemos o que ela significa, a dor é influenciada por fatores tanto fisiológicos quanto psicológicos, e por isso, em animais é avaliada de forma direta.

Neste sentido, o componente fisiológico da dor é denominado de nocicepção, com isso, modelos animais de analgesia são de fato modelos de nocicepção (TJOLSEN e HOLE, 1997). A dor é diagnosticada dependendo do conhecimento dos vários tipos de dor, como se propaga de um ponto a outro e quais seriam as diferentes causas da dor.

Em termos de duração, a dor pode ser transitória, aguda ou crônica. No caso transitório, a ativação dos transdutores nociceptivos é induzida na ausência de qualquer dano tecidual. Na dor aguda, ocorre ativação dos nociceptores em resposta a alguma lesão tecidual. Já a dor crônica, é comumente perpetuada por uma injúria ou doença, excede em duração a lesão tecidual (LOESER e MELZACK, 1999).

Quanto a sua origem, existem quatro tipos principais de dor. A “dor nociceptiva”, que se origina devido à estimulação excessiva dos nociceptores localizados na pele, vísceras e outros órgãos. A “dor neurogênica”, que reflete o dano de tecido neuronal na periferia ou no sistema nervoso central (“dor central”). Um outro tipo é a “dor neuropática”, que acontece devido a uma disfunção ou dano de um nervo ou grupo de nervos. Por último, a “dor psicogênica”, que não é oriunda de uma fonte somática identificável o que se pode refletir fatores psicológicos (FÜRST, 1999; MILLAN, 1999). Quando ocorre um significativo dano tecidual, a dor é geralmente mais persistente e acompanhada de inflamação. Nestas condições, geralmente ocorre um quadro de hipersensibilidade causado pela ativação e sensibilização dos nociceptores periféricos por mediadores químicos produzidos pela lesão tecidual e pela inflamação. Em pacientes que sentem dor com quadro de hipersensibilidade, alguns transtornos são observados, como hiperalgia (sensibilidade extrema ao estímulo doloroso), alodínia (dor em resposta a um estímulo mecânico não nocivo) e hiperestesia (sensibilidade anormal a um estímulo sensorial) (BESSON, 1999).

A partir de uma interação muito complexa de estruturas periféricas e centrais da superfície da pele ao córtex cerebral central ocorre a transmissão da dor (FÜRST, 1999).

Em condições normais, a dor está associada com a atividade elétrica nas fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro dos nervos periféricos. Estes nervos têm terminações sensoriais nos tecidos periféricos e são ativados por estímulos de vários tipos (*mecânico, térmico e químico*) (JULIUS e BASBAUM, 2001). Muitas

dessas fibras são fibras C não- mielinizadas, com baixas velocidades de condução ou fibras mielinizadas (A δ), que conduzem muito rapidamente.

Experiências realizadas com seres humanos, nos quais foram aplicados eletrodos de registro ou estimulantes aos nervos sensoriais cutâneos, mostraram que a estimulação das fibras (A δ) causou uma sensação de dor nítida e bem localizada, enquanto a atividade da fibra C causou uma dor em queimação (RANG et al., 2004).

Em tecidos animais, os processos inflamatórios envolvem e liberam alguns mediadores, incluindo: prostaglandinas, histamina, citocinas e proteinases, como também, substâncias que regulam a adesão de moléculas e os processos de migração, ativação e degranulação celular (HOLLANDER et al., 2003).

Várias formas e modelos de reações inflamatórias têm sido detectados. Por exemplo, respostas inflamatórias de pacientes asmáticos, inflamação no osso e articulação, infecção microbiana e condições alérgicas (OKAMOTO et al., 2004). Assim, é justificável e de grande importância, a utilização de diferentes modelos experimentais analgésicos e antiinflamatórios, dos medicamentos usados no sistema tradicional de saúde para dor, asma, artrite e reumatismo (OMISORE et al., 2004).

A atividade analgésica pode ser avaliada através de estímulos químicos induzidos por ácido acético e por formalina. As contorções abdominais induzidas pelo ácido acético representam um modelo de nocicepção periférica. Enquanto, o teste da formalina é mais específico e muito usado para o estudo de nocicepção. A aplicação de formalina produz resposta bifásica distinta: a primeira fase representa o efeito irritante da formalina nas fibras sensoriais do tipo C que caracteriza a dor neurogênica e a segunda fase é a dor inflamatória (BRAGGIO et al., 2002).

1.2. Drogas analgésicas e antiinflamatórias

1.2.1. Morfina

A *Papaver somniferum* L. é uma Papaverácea herbácea, da flora mediterrânea oriental, cultivada nos países quentes temperados para múltiplos efeitos: preparação de suas cápsulas com destino a Farmácias; para extração do látex (ópio); aproveitamento de suas sementes com interesse alimentar, farmacêutico e industrial, úteis em particular como oleagionosas (óleo de papoulas);

ainda, cultivada nos jardins como planta ornamental (www.farmacologia.com.br – Acessado em 05/10/05). O ópio contém muitos alcalóides relacionados com a morfina, codeína, tebaína e papaverina (TREASE e EVANS, 1978).

A morfina (**FIGURA 20**) foi o primeiro alcalóide a ser descoberto e isolado, começou a ser utilizado em 1850 em pequenos procedimentos cirúrgicos, para dor crônica e pós-operatória e como auxiliar na anestesia geral. Em 1902, foi determinada a estrutura da morfina e desde então foram estudadas muitas substâncias semi-sintéticas (produzidas pela modificação química da morfina) e opiáceos totalmente sintéticos (RANG et al., 2004). A meperidina, foi o primeiro opióide descoberto com uma estrutura completamente diferente da morfina (CALIXTO, 2000).

A morfina é eficaz em muitos tipos de dor aguda e crônica, como é antinociceptiva, reduz o componente afetivo da dor, o que reflete a sua ação supra-espinal, possivelmente ao nível do sistema límbico, que está provavelmente envolvido no efeito produtor da euforia, portanto, tem efeito analgésico (RANG et al., 2004).

A antinocicepção induzida pela morfina é mediada via ativação dos receptores opióides de membrana e, portanto, podem ser inibidos por antagonistas opióides, como a naloxona. Alguns efeitos colaterais indesejáveis da morfina, tais como, propriedades euforizantes, depressão respiratória, náusea, vômito, constipação e constrição pupilar parecem envolver ações mediadas pelos receptores (BENYHE, 1994).

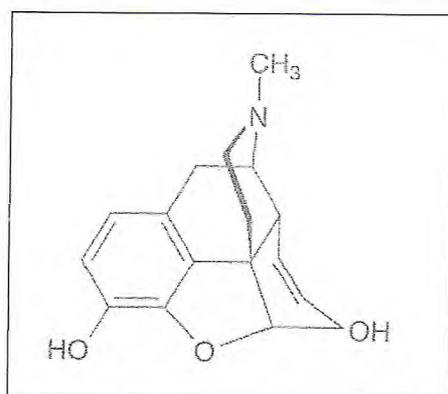


FIGURA 20: Fórmula estrutural da morfina (www.farmacologia.com.br – Acessado em 25/11/05).

1.2.2. Indometacina

A indometacina (**FIGURA 21**) tem propriedades analgésicas - antipirética e antiinflamatória marcante. Os efeitos antiinflamatórios da indometacina são evidenciados nos pacientes com artrite reumatóide e outros tipos de artrite, inclusive a gota aguda. Ela apresenta propriedade analgésica independente dos seus efeitos antiinflamatórios e, existem evidências, indicando que este medicamento tenha ação central e periférica, além de atividade antipirética. Trata-se também de um potente inibidor da cicloxigenase que produz prostaglandinas; também inibe a motilidade dos leucócitos polimorfonucleares. Como ocorre com muitos outros antiinflamatórios não-esteróidais (AINEs), a indometacina desaclopa a fosforilação oxidativa em concentrações supratrapêuticas e deprime a biossíntese dos mucopolissacarídios. A indometacina é absorvida rápida e completamente pelo trato gastrointestinal depois da administração oral. A concentração plasmática máxima é atingida dentro de duas horas no indivíduo em jejum (www.farmacologia.com.br – Acessado em 25/11/05).

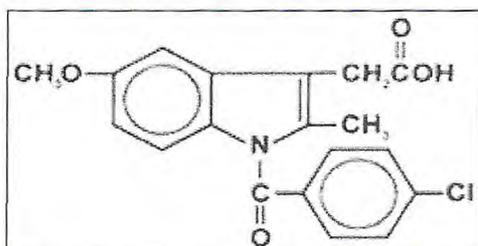


FIGURA 21: Fórmula estrutural da indometacina (www.farmacologia.com.br- Acessado em 25/11/05).

1.3. Lectinas de algas marinhas e propriedades farmacológicas

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 ou frações de dez 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 antinociceptivo periférico,

demonstrado pelo teste das contorções abdominais induzidas 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*, com taxas de inibição de 97,32 e 96,35, respectivamente (ANDRADE, 1999).

Todas 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) realizou testes analgésicos com a fração 0/60 (F 0/60) e a lectina purificada das algas *Bryothamnion triquetrum* (BT) e *Bryothamnion seaforthii* (BS) mostrando que elas possuíam efeito antinociceptivo 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.

Os efeitos analgésicos observados com as lectinas de BS e BT foram avaliados com utilização prévia de D-manose e avidina. A glicoproteína avidina é um inibidor da atividade hemaglutinante destas lectinas, e a D-manose é um resíduo encontrado em diversas porções da estrutura dessa glicoproteína. Com a presença de D-manose e avidina, a atividade inibitória da lectina de BS sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético, foi alterada, no caso de BT pela presença de D-manose. Como a D-manose não inibe a atividade hemaglutinante das lectinas, pode estar havendo um envolvimento desse açúcar na ação analgésica dessas proteínas (VIANA et al., 2002).

VIEIRA (2002) isolou uma nova lectina da alga *B. seaforthii* (PII-DEAE) de 16 kDa, encerrando 26,8 % de carboidrato em sua estrutura. Essa glicoproteína apresentou atividade antinociceptiva, quando testada em três modelos de dor animal (testes de contorções abdominais, formalina e placa quente) e também potencializou o tempo de sono induzido por pentobarbital; ainda, foi capaz de alterar a resposta no *Campo aberto*, porém, não modificou os valores no teste comportamental do *Rota Rod*. A fração F (0/60) da alga *B. seaforthii* sofreu tratamentos 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.

Levando em consideração a ação desnaturante do SDS no tratamento químico, o componente responsável pela atividade analgésica observada nas frações de *B. seaforthii* não deve ser uma proteína e sim a presença de carboidratos (VIANA et al., 2002).

Os carboidratos sulfatados totais de *B. seaforthii* (CSt) apresentam atividade antinociceptiva (VIEIRA et al., 2004). Quando os CSt de BS sofreram tratamento com uma solução de carboidrato a 1 %, em NaOH 1 M aquecida a 80 °C por 60 minutos, causou a dessulfatação do carboidrato. Apesar da diminuição do grau de sulfatação, a atividade analgésica das amostras (CSt nativa e tratada), permaneceu praticamente a mesma.

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

Muitos trabalhos têm sido conduzidos nos últimos anos, relacionas às propriedades farmacológicas de diferentes organismos marinhos. VÁZQUEZ-FREIRE et al. (1994), relataram os efeitos do extrato metanólico da alga parda *Laminaria ochroleuca* no sistema nervoso central de ratos. O extrato apresentou significativa atividade em todos os testes farmacológicos utilizados, exceto no teste de convulsão induzida por pentilenotetrazole. Extrato da alga *Cystoseira usneoides* apresentou efeito sedativo no sistema nervoso central em camundongos, com leve efeito analgésico (VÁZQUEZ-FREIRE et al., 1995).

Poucos dados de atividade antinociceptiva são encontrados com outras lectinas de macroalgas, logo, estas lectinas já estudadas representam um modelo para novas drogas com atividades antinociceptivas.

2. OBJETIVOS

- ✓ Avaliar a atividade antiinflamatória da lectina de *M. echinocarpa* através do teste de edema de pata induzido por carragenina e dextrano em camundongos.

- ✓ Investigar o potencial analgésico da lectina de *M. echinocarpa* em camundongos usando os testes de contorções abdominais induzidos por ácido acético e/ou formalina.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*), variedade Swiss-Webster, machos, pesando entre 20 e 30 gramas, adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará, mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia, em caixas próprias, em salas com temperatura ambiente e livre acesso à ração e água.

3.2. Reagentes

Ciproeptadina – (Sigma, U.S.A.); Formaldeído – (Reagente-Brasil); Indometacina (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA); Naloxona – (Sigma, U.S.A.); Sulfato de Morfina (Dimorf) – (Cristália, Brasil).

Os demais reagentes foram de grau analítico e, obtidos comercialmente.

3.3. Estudo da Atividade Antiinflamatória

3.3.1. Edema de Pata Induzido por Carragenina em Camundongos

O modelo de edema de pata induzido por carragenina foi realizado segundo o método de WINTER et al.(1962). Para tanto, foram utilizados camundongos pesando de 20 a 30g, escolhidos aleatoriamente. Suas patas traseiras foram estendidas e introduzidas em Pletismógrafo (Ugo Basile, Itália) até à borda póstero-proximal da proeminência do calcanhar e, em seguida, o volume de líquido deslocado (V1) antes da injeção de carragenina (t=0), foi então registrado em um monitor digital.

O edema de pata induzido por carragenina, representa um modelo muito usado para estudar atividade antiinflamatória de drogas esteroidais e não esteroidais (TUBARO et al., 1986). Tal experimento envolve a liberação de vários mediadores induzindo uma reação inflamatória em duas fases diferentes: a fase inicial que ocorre de zero até três horas após a injeção do agente flogístico, sendo atribuída a ação da histamina, serotonina e bradicinina (VINGER et al., 1987) e a fase tardia que depende da produção de prostaglandinas dos tecidos (DI ROSA et al., 1971).

Os animais foram tratados por via oral (v.o), com a lectina da alga *Meristiella echinocarpa*, nas doses de 1; 5; 10 e 20 mg/kg de animal e por via intraperitoneal, nas doses de 0,1; 1; 5; e 10 mg/Kg de animal, trinta minutos antes de uma injeção intraplantar de 0,1 ml de uma solução de carragenina a 1% p/v, na pata traseira esquerda. A indometacina (10 mg/kg, i.p) foi utilizada como padrão positivo. O grupo controle foi tratado com água destilada 1ml/kg via oral. O volume das patas foi medido nos intervalos de 1, 2, 3, 4 e 24 horas, após o último tratamento. O volume do edema (VE), decorrente de uma reação inflamatória aguda, foi determinado pela diferença entre o volume final (VF) e o volume inicial (VI) das patas.

3.3.2. Edema de Pata Induzido por Dextrano em Camundongos

Camundongos machos pesando entre 20 e 30 g, escolhidos ao acaso, foram divididos em grupos, suas patas direitas traseiras foram medidas em pletismógrafo e em seguida tratados com a lectina de *M. echinocarpa* (0,01; 0,1; 1; 5 e 10 mg/Kg i.p. e v.o.), ciproeptadina (15 mg/Kg i.p.) e controle (água destilada 1 mL/Kg i.p.). Trinta minutos depois todos os animais receberam uma injeção subplantar na pata traseira direita de 0,1 mL de uma solução de dextrano 1,5 %. O volume das patas foram medidas novamente (método de WINTER et al., 1962) antes e, 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção subplantar do dextrano. A variação do volume das patas, foi calculada através da diferença entre o volume final e o volume inicial das patas.

3.4. Determinação da Atividade Analgésica

3.4.1. Teste das Contorções Abdominais Induzidas pelo Ácido Acético (*Writhing Test*)

O modelo das contorções abdominais, induzidas pelo ácido acético 0,6%, foi desenvolvido segundo o método originalmente descrito para ratos por VANDER e MARGOLIN (1956) e posteriormente modificado para camundongos por KOSTER et al. (1959). Nesses experimentos, foram empregados camundongos Swiss, machos, pesando entre 20 e 30g e reunidos em grupos de 8 animais.

Os animais foram pré-tratados com a lectina de *Meristiella echinocarpa* (0,01; 0,1; 1; 5 e 10 mg/Kg, via intraperitoneal e via oral); o grupo controle recebeu água

destilada 0,1 ml/kg i.p (meio de dissolução de todas as amostras). Decorridos 60 minutos após o tratamento por via oral e 30 minutos após o tratamento por via intraperitoneal, os animais receberam a injeção de ácido acético (0,1 ml/kg i.p).

A resposta dos diferentes grupos de animais foi avaliada 10 minutos após a administração de ácido acético, quando foi quantificado o número de "Writhing" (contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão das patas posteriores) durante 20 minutos.

3.4.2. Teste da Formalina

Esse teste foi realizado em camundongos Swiss, machos, pesando entre 20 e 30g, seguindo o método de DUBUISSON e DENNIS (1977) modificado por HUNSKAAR et al. (1985). Nesse experimento, o tempo gasto (s) pelo animal lambendo a pata é registrado durante dois períodos após a injeção intraplantar de 20 µl 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).

A lectina da alga *M. echinocarpa* foi administrada nas doses de (0,1; 1; 5 e 10 mg/Kg) via intraperitoneal e (1; 5 e 10 mg/Kg) via oral. Ao grupo controle foi administrado um volume de água destilada (0,1 ml/kg i.p). A morfina foi utilizada como controle positivo, na dose de 5mg/kg i.p. A aplicação de formalina ocorreu após 60 minutos do pré-tratamento por via oral e 30 minutos do tratamento por via intraperitoneal.

O efeito de uma droga antagonista da morfina, foi determinado pela administração subcutânea de naloxona (2 mg/Kg via subcutânea), quinze minutos antes dos tratamentos com a lectina de *M. echinocarpa* (2 mg/Kg) e morfina (5 mg/Kg i.p).

3.5. Análise Estatística

Nos procedimentos experimentais, os resultados dos testes realizados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.), empregando-se análise de variável ANOVA e o Teste Student-Newman-Keuls como Teste *pos hoc*. Os dados foram considerados significativos quando a possibilidade de ocorrência da hipótese nula, foi igual ou inferior a 5% ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Determinação da atividade antiedematogênica da lectina de *Meristiella echinocarpa*.

4.1.1. Modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongo

A atividade antiinflamatória da lectina de *M. echinocarpa* (ME) foi investigada utilizando o modelo de inflamação aguda, edema induzido por injeção de carragenina na pata de camundongo.

A **TABELA 5** apresenta os valores (média±EPM) do volume do edema de pata (mL) medido com 1, 2, 3, 4 e 24 horas após a administração de carragenina, referentes aos grupos controle e tratados com a lectina de *M. echinocarpa* nas doses de 0,1, 1, 5 e 10 mg/Kg i.p. e 1, 5, 10 e 20 mg/Kg v.o. A análise estatística dos dados revelou que a lectina nas doses de 1 e 10 mg/Kg i.p. causou diminuição significativa do edema de pata, com 3 e 4 horas após a administração de carragenina, em relação ao grupo controle. Como controle positivo foi utilizado a indometacina na dose de 10 mg/Kg i.p., apresentando uma inibição do volume do edema em 36, 40 e 47 %, após 2, 3 e 4 horas, respectivamente.

Os dados da **TABELA 5** foram utilizados para a construção do gráfico apresentado na **FIGURA 22** com as doses que apresentaram significantes. Para a dose de 1mg/Kg i.p., o valor de inibição expresso em porcentagem em relação ao controle foi o mesmo 47%, com 3 e 4 horas. Para a dose de 10 mg/Kg i.p., os valores de inibição foram 35 e 39 %, com 3 e 4 horas, respectivamente. As doses de 0,1 e 5 mg/Kg i.p., não produziram efeito significativo.

Quando a lectina de ME foi administrada por via oral, apenas a dose de 10 mg/Kg apresentou inibição de 43, 47 e 47%, com 2, 3 e 4 horas, respectivamente. As doses de 1, 5 e 20 mg/Kg não tiveram efeito significativo.

Resultados semelhantes foram observados com a lectina de *Amansia multifida* que apresentou redução do volume do edema nas doses de 0,5 e 10 mg/Kg i.p. (NEVES, 2005).

TABELA 5: Efeito da lectina de *Meristiella echinocarpa* no edema de pata induzido por carragenina em camundongos.

Grupos	Dose/Via de administração (mg/Kg)	Volume do edema (mL) (% Inibição)				
		1h	2h	3h	4h	24h
Controle	1 mL/Kg, i.p. (16)	0,01±0,005	0,13±0,007	0,15±0,007	0,15±0,007	0,09±0,007
Indometacina	10 (i.p.) (8)	0,07±0,007	0,09±0,01* (36%)	0,09±0,01*** (40%)	0,08±0,01*** (47%)	0,08±0,006
	0,1 (8)	0,08±0,01	0,13±0,01	0,13±0,01	0,13±0,01	0,1±0,009
Lectina <i>Meristiella echinocarpa</i> (i.p.)	1,0 (16)	0,08±0,008	0,09±0,01	0,08±0,01*** (47%)	0,08±0,01*** (47%)	0,08±0,006
	5,0 (16)	0,09±0,01	0,1±0,01	0,1±0,008	0,1±0,01	0,08±0,01
Lectina <i>Meristiella echinocarpa</i> (v.o.)	10 (8)	0,08±0,01	0,1±0,01	0,098±0,01* (35%)	0,092±0,01** (39%)	0,06±0,01
	1,0 (8)	0,09±0,007	0,1±0,005	0,14±0,007	0,14±0,009	0,07±0,01
	5,0 (8)	0,08±0,04	0,12±0,006	0,14±0,01	0,15±0,009	0,08±0,005
	10 (8)	0,08±0,007	0,09±0,01* (34%)	0,08±0,01*** (47%)	0,08±0,001*** (47%)	0,08±0,005
	20 (8)	0,01±0,009	0,15±0,01	0,16±0,01	0,16±0,01	0,11±0,01

Valores representam média ± E.P.M.

*** P<0,001; ** P<0,01; * P< 0,05 Student-Newman-Keuls Method (comparado ao grupo controle)

() número de animais por grupo

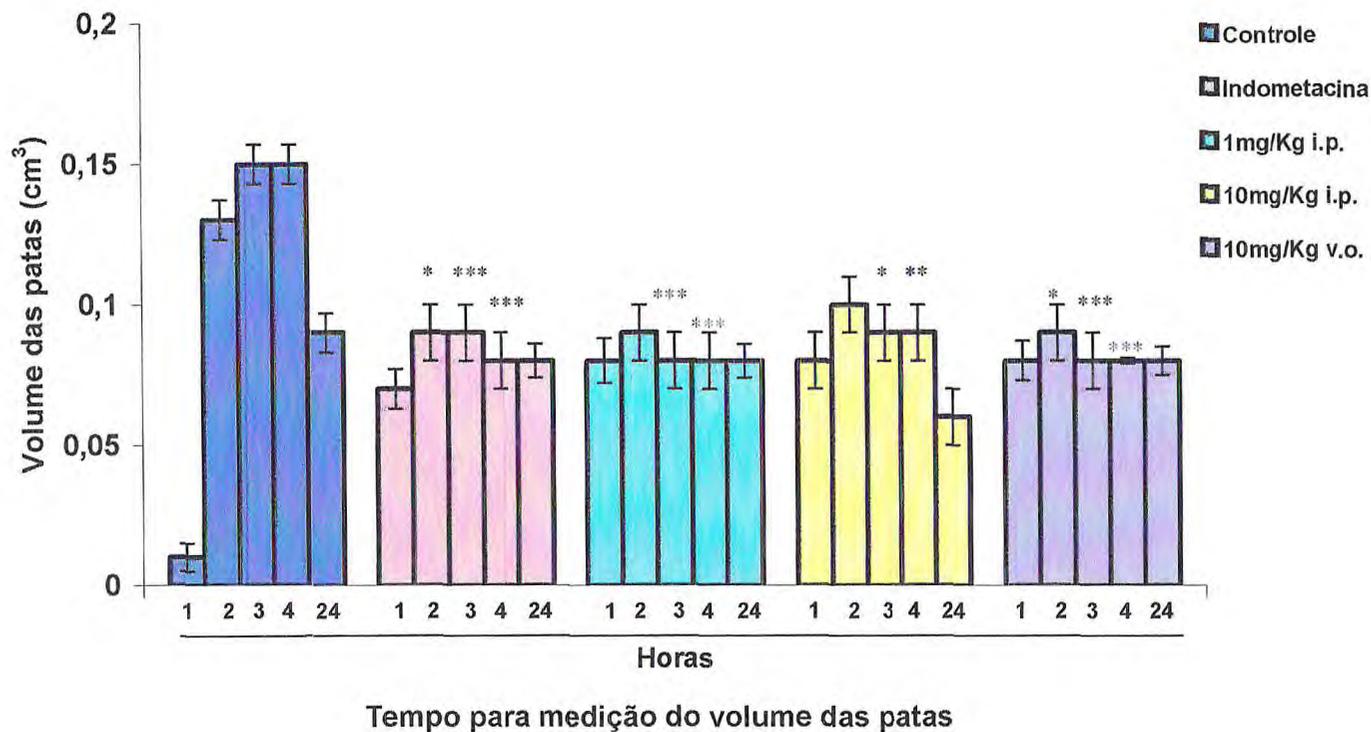


FIGURA 22: Ação da lectina de *Merisitella echinocarpa* (1 e 10 mg/Kg i.p.; e 10 mg/Kg v.o.) e indometacina (10 mg/Kg i.p.) sobre o edema de pata induzido por carragenina (1 %) em camundongos. *** P<0,001; ** P<0,01; * P< 0,05 comparado ao grupo controle (Student Newman-Keuls Method).

A lectina de *Bryothamnion triquetrum*, na dose de 10 mg/Kg i.p., reduziu significativamente o edema logo a partir da 1ª hora, após a aplicação da carragenina (ANDRADE, 1999).

O edema induzido por injeção de carragenina é utilizado para determinar a atividade antiinflamatória. A inflamação é uma reação imediata e não-específica do organismo contra agressões física, química ou microbiológica. Muitos métodos são usados para testar drogas antiinflamatórias, utilizando a inibição do edema de pata por agentes edematogênicos, incluindo histaminas, albumina, carragenina, dextrano e outros (NETO et al., 2004).

A carragenina, um polissacarídeo sulfatado obtido da alga *Chondrus crispus*, é um agente flogístico de escolha para a investigação da atividade antiinflamatória de compostos químicos (GARDNER, 1960). Esta substância induz artrite experimental em coelhos. A resposta deste material depende inteiramente de um estímulo local, não apresenta potencial antigênico, não produz efeitos sistêmicos, manifesta um elevado grau de reprodutibilidade e sua ação pode ser inibida por antiinflamatórios esteroidais e não esteroidais (WINTER et al., 1962; KATSUHIKO e TAKASSHI, 1982; TUBARO et al., 1985).

A inflamação aguda envolve a síntese ou liberação de vários mediadores, inclusive histamina, 5-hidroxitriptamina (5-HT), bradicininas, e prostaglandinas, todos podem causar dor e febre (SILBERNAGL e LANG, 2000).

DI ROSA et al. (1971) reavaliaram o papel desses mediadores no edema induzido por carragenina. Os resultados obtidos demonstraram três fases distintas envolvidas na resposta inflamatória aguda. A primeira relaciona-se à liberação de histamina e 5-HT, a segunda fase envolve a liberação de bradicinina enquanto as prostaglandinas estão envolvidas na última fase (VINGER et al., 1987).

Evidências indicaram a histamina e 5-HT como responsáveis pela ocorrência de vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular na etapa inicial do processo inflamatório (RANG et al., 2004).

Nas reações inflamatórias agudas, a bradicinina têm sido implicada devido a sua habilidade de induzir o aumento da permeabilidade de vasos sangüíneos para componentes do plasma. RONALD e CHRISTOPHER (1990) e DAMAS e REMACLE-VOLON (1992), demonstraram o envolvimento da bradicinina no edema induzido por carragenina na pata de rato, utilizando antagonistas de receptor dessa cinina.

As prostaglandinas são originárias do ácido araquidônico, após este ser liberado dos fosfolípidos por ação da enzima fosfolipase A2.

O mecanismo de ação de várias drogas antiinflamatórias não-esteróidicas (NSAIDs), como aspirina, fenilbutazona e indometacina, bloqueiam a produção de prostaglandinas por inibição irreversível da cicloxigenase (COX) (VANE et al., 1998).

A COX existe em duas isoformas, COX-1 e COX-2, cada uma com um padrão de expressão distinto em vários tipos de células. A COX-1 é uma enzima constitutiva encontrada em mucosa gástrica, plaquetas, endotélio vascular e rim, que pode funcionar em respostas vasculares e pode catalisar geração dos hormônios necessários em condições não-inflamatórias. Enquanto a COX-2 é indutível e é gerada em resposta à inflamação, é expressa principalmente, em macrófagos ativados e monócitos (SEIBERT et al., 1994, MASFERRER et al., 1994).

Outra característica do edema induzido por carragenina é a presença de leucócitos polimorfonucleares na última fase, inibindo o processo inflamatório (NETO et al., 2004).

De acordo com os resultados apresentados, a lectina de ME nas doses de 1 mg/Kg i.p. e 10 mg/Kg v.o., foram as doses mais potentes e semelhantes a indometacina, sugerindo produzir efeito antiinflamatório contra edema induzido por carragenina.

4.1.2. Modelo de edema de pata induzido por dextrano em camundongo

A **TABELA 6** mostra os valores (média±EPM) do volume do edema de pata (mL) medido com 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção de dextrano, referentes ao grupo controle e tratados com lectina de *M. echinocarpa* nas doses de 0,1; 1; 5 e 10 mg/Kg i.p.e v.o. A análise estatística dos dados revelou que a lectina de ME, nas doses de 0,1; 1 e 5 mg/Kg i.p., causou redução significativa do edema de pata em relação ao grupo controle. Na **FIGURA 23** estão os dados representando as doses significantes. Para a dose de 0,1 mg/Kg, os valores de inibição expressos em porcentagem em relação ao controle foram 45, 33 e 40 %, com 1, 2 e 3 horas,

TABELA 6: Efeito da lectina *Meristiella echinocarpa* no edema de pata induzido por dextrano.

Grupos	Dose/Via de administração (mg/Kg)	Volume do edema (mL) (% Inibição)			
		1h	2h	3h	4h
Controle	1 mL/Kg i.p. (16)	0,10±0,008	0,12±0,006	0,12±0,004	0,008±0,004
Ciproheptadina	15 (i.p.) (8)	0,08±0,005	0,07±0,007*** (42%)	0,07±0,005*** (42%)	0,04±0,005* (50%)
	0,01 (i.p.) (8)	0,06±0,008*	0,009±0,01	0,07±0,007*** (42%)	0,05±0,007
Lectina <i>Meristiella echinocarpa</i> (i.p.)	0,1 (8)	0,055±0,01** (45%)	0,08±0,007* (33%)	0,06±0,01** (40%)	0,05±0,007
	1,0 (12)	0,08±0,07	0,07±0,01** (42%)	0,08±0,008* (33%)	0,06±0,006
	5,0 (12)	0,08±0,007	0,09±0,007	0,06±0,0007*** (50%)	0,07±0,007
	10 (8)	0,08±0,01	0,09±0,007	0,1±0,008	0,07±0,005
Lectina <i>Meristiella echinocarpa</i> (v.o.)	0,01 (8)	0,08±0,007	0,1±0,008	0,1±0,007	0,09±0,007
	0,1 (8)	0,07±0,008	0,1±0,008	0,08±0,01* (33%)	0,06±0,01
	1,0 (7)	0,08±0,01	0,1±0,01	0,1±0,01	0,08±0,009
	5,0 (8)	0,07±0,008	0,09±0,008	0,07±0,008** (42%)	0,06±0,01
	10 (8)	0,09±0,01	0,1±0,01	0,1±0,01	0,09±0,01

Valores representam média ± E.P.M.

*** P<0,001; ** P<0,01; * P< 0,05 Student-Newman-Keuls Method (comparado ao grupo controle)

() número de animais por grupo

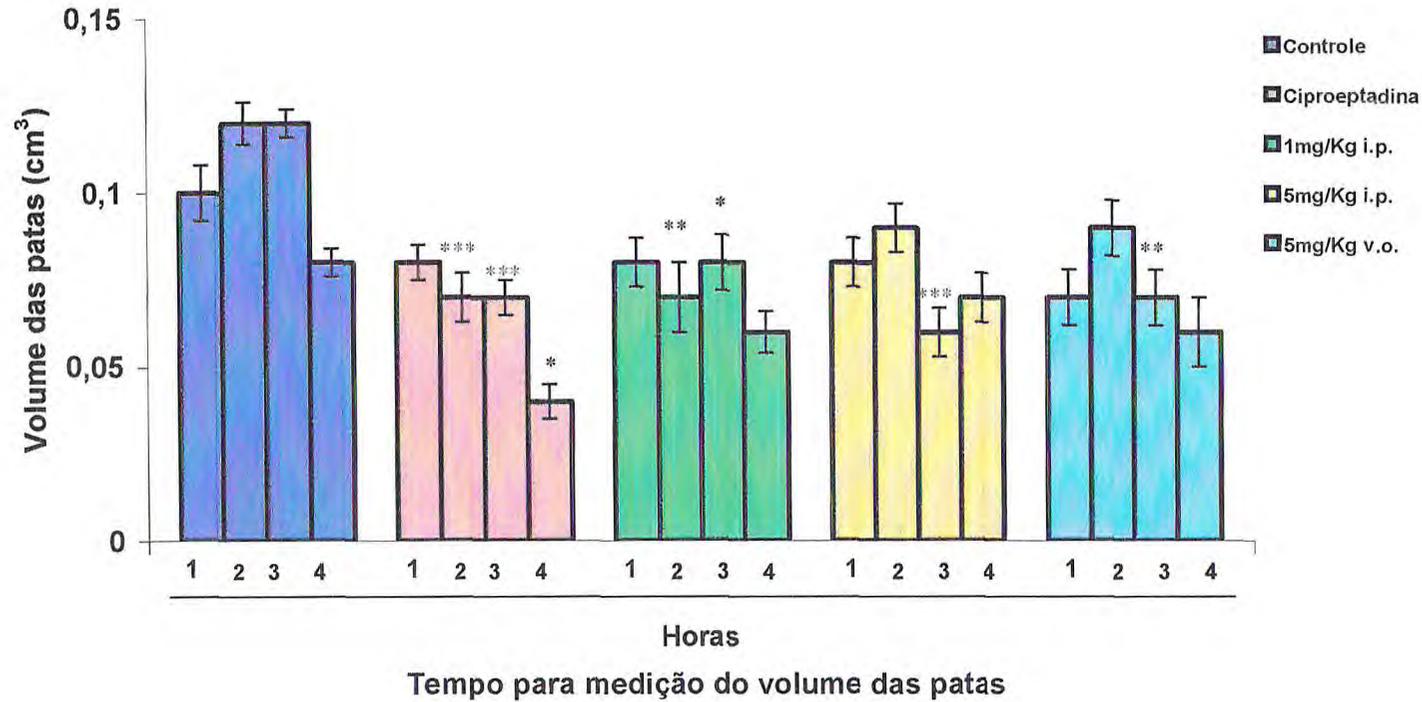


FIGURA 23: Ação da lectina de *Merisitella echinocarpa* (1 e 5 mg/Kg i.p.; e 5 mg/Kg v.o.) e ciproheptadina (15 mg/Kg i.p.) sobre o edema de pata induzido por dextrano (1,5 %) em camundongos. *** P<0,001; ** P<0,01; P<0,05 comparado ao grupo controle (Student-Newman-Keuls Method).

respectivamente, após a injeção do dextrano. Para a dose de 1 mg/Kg i.p., os valores de inibição foram 42 e 33 %, com 2 e 3 horas, respectivamente.

A lectina de ME na dose de 5 mg/Kg, mostrou uma diminuição do volume do edema em relação ao controle de 50 %, apenas na 3ª hora. A dose maior (10 mg/Kg) não produziu efeito significativo.

Quando a lectina foi administrada por via oral, as doses de 0,1 e 5 mg/Kg apresentaram inibição em relação ao controle de 33 e 42 %, respectivamente, na 3ª hora. As doses de 0,1, 1 e 10 mg/Kg não apresentaram efeito significativo.

A redução do edema foi significativa na 2ª, 3ª e 4ª horas para a ciproheptadina (controle positivo) na dose de 15 mg/Kg i.p., os valores observados para a inibição corresponderam a 42, 42 e 50 %, respectivamente.

Para a lectina de *Amansia multifida*, o edema de pata induzido por dextrano não apresentou efeito significativo. Somente na 3ª hora da dose de 0,5 mg/Kg i.p., observou uma redução do edema de pata em relação ao controle (NEVES, 2005).

O edema induzido por dextrano, um polissacarídeo composto por monômeros de α -D-glucose, derivado da ação da bactéria *Leuconostoc mesenteroides* sobre a ação da sacarose, resulta principalmente da liberação de histamina e 5-HT (serotonina) (KATZ et al., 1984), conseqüente à degranulação de mastócitos (LO et al., 1982).

A histamina é liberada por mastócitos por exocitose durante as reações inflamatórias ou alérgicas e, tem a capacidade de produzir muito dos efeitos da inflamação e hipersensibilidade: vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e espasmo da musculatura lisa (RANG et al., 2004). A 5-HT também pode causar vasodilatação, em parte ao atuar sobre as células endoteliais, induzindo a liberação de óxido nítrico. É principalmente a forma induzível da NO sintetase que está envolvida nas reações inflamatórias, em resposta à estimulação das citocinas.

Segundo Payan e Katzung (1995), a redução da inflamação pelo uso de fármacos antiinflamatórios resulta em alívio da dor por determinados períodos de tempo. Além disso, a maioria dos analgésicos não opióides (aspirina e outros) também exercem efeito antiinflamatório e são portanto adequados para o tratamento de doenças antinnflamatórias aguda e crônica.

Diante desses fatos e considerando a atividade antiedematogênica apresentada pela lectina de *Merisitella echinocarpa*, foi investigada sua propriedade analgésica.

4.2. Determinação da atividade antinociceptiva da lectina de *M. echinocarpa*

4.2.1. Teste de contorções abdominais pelo ácido acético em camundongos

No teste das contorções abdominais, os animais tratados com a lectina de *M. echinocarpa* (0,001; 0,01; 0,1; 1; 5 e 10 mg/Kg i.p.), apresentaram diminuição do número de contorções (25,7±2,7; 19,71±1,93; 15,56±1,59; 14,85±2,17; 15,57±3,04; 13,57±2,39 contorções/20 min, respectivamente) em relação aos animais do grupo controle (40,5±1,18), correspondendo a uma inibição de 37, 51, 62, 63 62, e 66 %, respectivamente. O mesmo aconteceu quando os animais foram tratados por via oral, nas mesmas doses (29,28±2,61; 26,4±1,90; 25,61±2,83; 24,14±1,88; 19,7±2,12; 19,1±3,17, respectivamente), resultando em uma inibição de 34, 40 ,42, 46, 56 e 57 %, respectivamente (**TABELA 7 e FIGURA 24**).

Como podemos observar na avaliação da atividade analgésica, a lectina de *M. echinocarpa*, inibiu em até 66 % as contorções produzidas pelo ácido acético a 0,6 %, em camundongos, nas doses intermediárias a percentagem de inibição é praticamente a mesma.

ANDRADE (1999) demonstrou que os extratos ou frações de dez algas marinhas apresentaram atividade analgésica através do teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Destes extratos concentrados aplicados na concentração de 10 mg/Kg por via intraperitoneal, os das algas *Gracilaria caudata* e *Meristiella echinocarpa* foram os mais ativos, com valores de inibição das contorções abdominais correspondentes a 97,32 e 96,0 %, respectivamente.

Para avaliar a interação lectina-carboidrato na atividade antinociceptiva de lectinas de algas marinhas, VIANA et al. (2002) estudaram o efeito da glicoproteína avidina (potente inibidor da atividade hemaglutinante das lectinas de *Bryothamnion triquetrum* e *B. seaforthii*) e D-manose (presente na estrutura da glicoproteína). Interessante observar que houve um total bloqueio no efeito antinociceptivo de *B. seaforthii* por D-manose e não por avidina, sugerindo que o domínio de ligação a carboidrato são importante para o efeito biológico da lectina. No caso de *B. triquetrum*, houve apenas um bloqueio parcial do efeito antinociceptivo com avidina, um bloqueio total foi observado na presença de D-manose.

TABELA 7: Estudo de inibição da lectina *Meristiella echinocarpa*, no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos.

Grupo	Dose/via de administração (mg/Kg)	Nº de contorções (20 minutos)	% de Inibição das contorções
Controle (i.p.)	1 ml/Kg (17)	40,5±1,18	
	0,001 (7)	25,7±2,7***	37
Lectina de <i>Meristiella echonocarpa</i> (i.p.)	0,01 (7)	19,71±1,93***	51
	0,1 (16)	15,56±1,59***	62
	1,0 (8)	14,85±2,17***	63
	5,0 (8)	15,57±3,04***	62
	10 (8)	13,57±2,39***	66
	1 ml/Kg (13)	44,3±0,91	
Controle (v.o.)	0,001 (7)	29,28±2,64***	34
	0,01 (7)	26,4±1,90***	40
Lectina de <i>Meristiella echonocarpa</i> (v.o.)	0,1 (13)	25,61±2,83***	42
	1,0 (7)	24,14±1,88***	46
	5,0 (7)	19,7±2,12***	56
	10 (7)	19,1±3,17***	57

Valores representam média ± E.P.M.

*** P<0,001 Student-Newman-Keuls Method (comparado ao grupo controle)

() número de animais por grupo

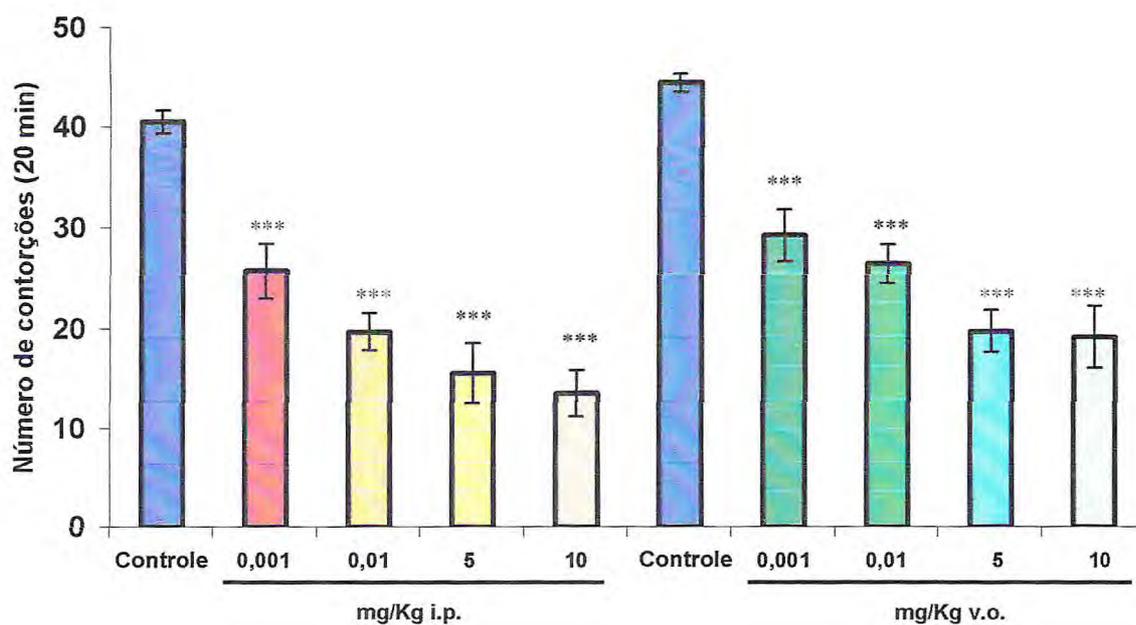


FIGURA 24: Ação da lectina de *Merisitella echinocarpa* (0,001; 0,01; 5 e 10 mg/Kg i.p. e v.o.) sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos. *** $P < 0,001$ comparado ao grupo controle (Student Newman-Keuls Method).

Como D-manose não inibe a atividade hemaglutinante das lectinas, a disponibilidade de resíduos de D-manose na estrutura da avidina pode ser um requerimento para que a interação lectina-avidina ocorra.

O efeito da glicoproteína avidina, também foi observado com a lectina da alga marinha *Amansia multifida* no teste das contorções abdominais, apresentando bloqueio parcial e total do efeito antinociceptivo da lectina, pela avidina e D-manose, respectivamente (NEVES, 2005).

Nossos resultados foram semelhantes a extratos do caule de *Dorstenia barteri* nas doses de 50 e 100 mg/Kg i.p., com uma diminuição do número de contorções de $30,4 \pm 7,6$ e $30,6 \pm 9,8$ (OMISORE et al., 2004).

O teste de contorções abdominais é baseado na aplicação de um estímulo químico de alta intensidade (ácido acético) e a resposta nociceptiva é de curta duração, representa um modelo de nocicepção periférica. Este não é um modelo específico, uma vez que diferentes classes de substâncias também inibem as contorções, como os hipotensores, anti-histamínicos, antiinflamatórios não-esteroidais, estimulantes e depressores do SNC (HENDERSHOT e FORSAITH, 1959; COLLIER et al., 1968; YEN, 1985; TAKAHASHI e PAZ, 1987, SANTOS et al., 1998). Isso reflete a inespecificidade desse teste no que diz respeito a identificação de drogas com atividade analgésica, os resultados foram confirmados utilizando-se o teste da formalina.

Como podemos observar na **FIGURA 24**, as doses (0,001; 0,01 e 10 mg/Kg i.p.) e (0,001; 0,1 e 10 mg/Kg v.o.) apresentaram efeito dose-dependente.

4.2.2. Teste da Formalina

Os resultados do teste de formalina realizado com a lectina de *Meristiella echinocarpa*, mostram que o grupo controle apresentou um tempo de lambertura da pata na primeira fase de $55,4 \pm 1,79$ s, e na segunda fase de $32,19 \pm 1,46$ s. Os grupos tratados com a lectina de *M. echinocarpa*, quando inicialmente injetada por via intraperitoneal e oral nas doses de 1; 5 e 10 mg/Kg, mostrou efeito antinociceptivo nas duas fases do experimento (inicial – 1ª fase e tardia – 2ª fase). As doses de 1, 5 e 10 mg/Kg i.p., alteraram o tempo de lambertura na primeira fase ($36,69 \pm 2,62$; $40,9 \pm 2,7$ e $22,76 \pm 2,7$ s, respectivamente) em relação ao grupo controle, mostrando

uma inibição significativa de 34, 26 e 59 %, respectivamente, e na segunda fase ($18,13 \pm 2,23$; $17,0 \pm 2,38$ e $9,3 \pm 2,04$ s, respectivamente), em relação ao grupo controle, apresentando uma inibição de 44, 47 e 71 %, respectivamente. Assim também, a lectina de ME nas doses de 1, 5 e 10 mg/Kg v.o., alterou o tempo de lambertura da pata na primeira fase ($12,1 \pm 1,8$; $37 \pm 2,9$ e $36 \pm 2,17$ s, respectivamente) e na segunda fase ($12,1 \pm 3,2$; $8,7 \pm 1,62$ e $8,0 \pm 1,7$, respectivamente), em relação ao grupo controle, mostrando uma inibição de 57, 69 e 71 %, respectivamente. **(TABELA 8 e FIGURA 25).**

A morfina, um agonista opiáceo, na dose de 5 mg/Kg i.p., diminuiu significativamente a primeira ($24,7 \pm 2,5$ s) e segunda fase ($6,85 \pm 1,89$ s), com relação ao grupo controle, mostrando uma inibição de 53 e 79 %, respectivamente. Essa inibição foi revertida quando a naloxona (dose de 2 mg/Kg i.p.) aumentou o tempo de lambertura da pata na primeira e segunda fases ($69,71 \pm 1,98$ s e $23,2 \pm 2,38$ s, respectivamente) quando comparada ao controle. O grupo tratado com naloxona (2 mg/Kg i.p.) juntamente com a lectina de *M. echinocarpa* (5 mg/Kg i.p.) mostrou um aumento no tempo de lambertura na primeira e segunda fases ($64,6 \pm 2,19$ s e $36,9 \pm 2,36$ s, respectivamente) com relação ao controle. Logo, a naloxona reverteu o efeito da lectina de *M. echinocarpa* (5 mg/Kg i.p.), observado na primeira e segunda fase **(TABELA 9 e FIGURA 26).**

O teste de formalina permite avaliar como um animal responde a dor contínua e moderada causada por injúria tecidual, sendo mais específico e muito usado para o estudo de nocicepção (BRAGGIO et al., 2002). Esse teste consiste na aplicação de um estímulo químico (formaldeído a 1 %) para indução de nocicepção em camundongos.

A injeção de formalina produz resposta bifásica distinta: a primeira fase parte imediatamente após a injeção da formalina e continua por 5 minutos, representa o efeito irritante da formalina nas fibras sensoriais do tipo C que caracteriza a dor neurogênica e a segunda fase é caracterizada pelo retorno de altos níveis de nocicepção começando 15-30 minutos após a injeção da formalina e, liberação de vários mediadores inflamatórios, como a setoronina, histamina, bradicinina e prostaglandinas (HUNSKAAR et al., 1985; MURRAY et al., 1988). Estas fases apresentam diferentes propriedades e são ferramentas muito úteis não somente para avaliar a potência do analgésico, mas também para elucidar o mecanismo de

TABELA 8: Estudo da lectina *Meristiella echinocarpa* na nocicepção induzida pela formalina em camundongos.

Grupo	Dose/via de administração (mg/Kg)	Tempo (segundo)		% de Inibição	
		1ª fase	2ª fase		
Controle (i.p.)	1 mL/Kg (31)	55,4±1,79	32,19±1,46	-	-
Lectina de <i>Meristiella echinocarpa</i> (i.p.)	1,0 (13)	36,69±2,62***	18,13±2,23**	34	44
	5,0 (15)	40,9±2,7**	17,0±2,38**	26	47
	10 (13)	22,76±2,7***	9,3±2,04***	59	71
Controle (v.o.)	1 mL/Kg (31)	52,32±2,05	28,0±1,42	-	-
Lectina de <i>Meristiella echinocarpa</i> (v.o.)	1,0 (8)	29,37±1,8***	12,1±3,2*	44	57
	5,0 (8)	37±2,9*	8,7±1,62**	29	69
	10 (8)	36±2,17*	8,0±1,7**	31	71

Valores representam média ± E.P.M.

*** P<0,001; ** P<0,01 Student-Newman-Keuls Method (comparado ao grupo controle)

() número de animais por grupo

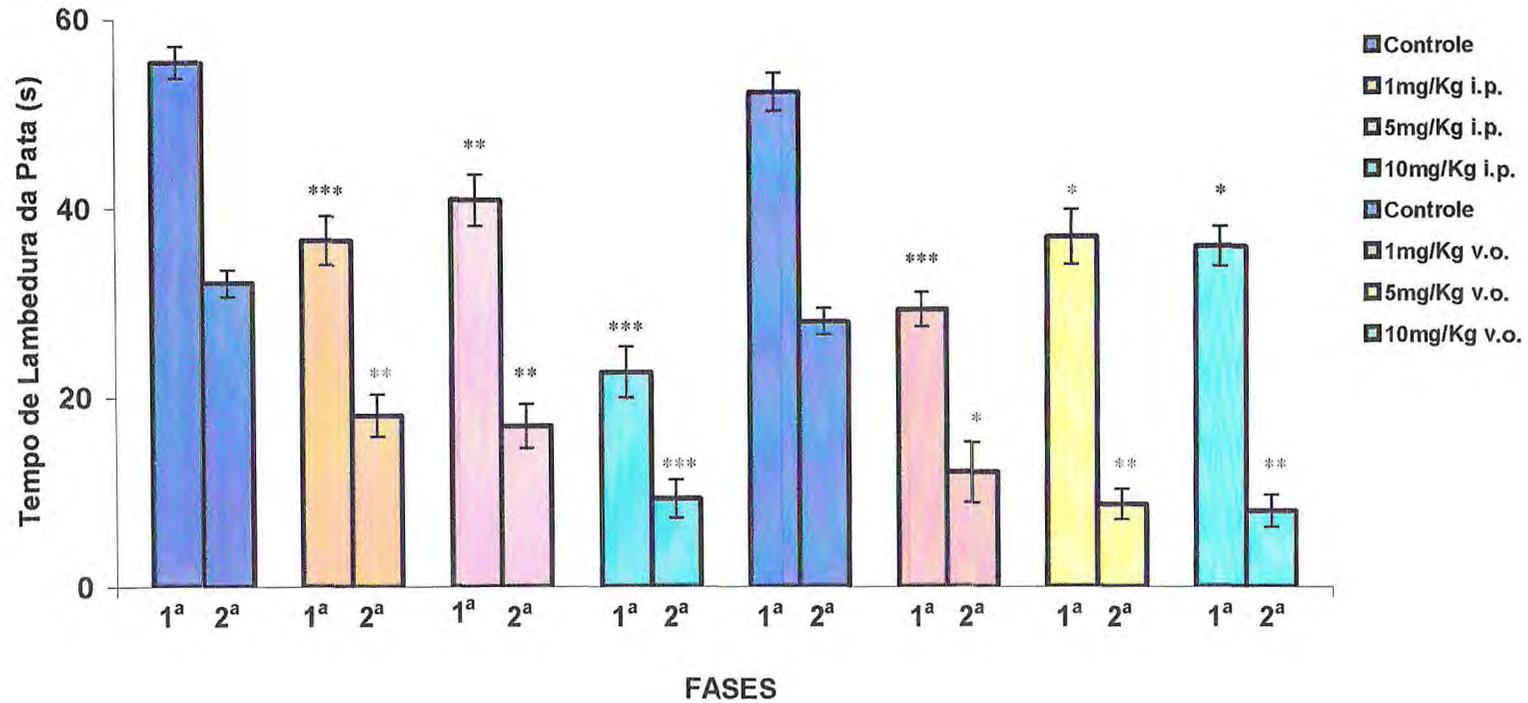


FIGURA 25: Estudo da atividade analgésica da lectina de *Meristiella echinocarpa* (1; 5 e 10 mg/Kg i.p. e v.o.), no modelo de formalina, em camundongos. *** P<0,001; ** P<0,01; * P< 0,05 comparado ao grupo controle (Student Newman-Keuls Method).

TABELA 9: Avaliação da participação do sistema opióide no efeito da lectina de *Meristiella echinocarpa*, na nocicepção induzida pela formalina em camundongos.

Grupo	Dose/via de administração (mg/Kg)	Tempo (segundo)		% de Inibição	
		1ª fase	2ª fase		
Controle	1 mL/Kg (i.p.) (15)	52,9±2,11	29,4±1,82	-	-
Lectina de <i>Meristiella echinocarpa</i>	5,0 (i.p.) (8)	31,3±1,59***	8,37±2,0***	41	72
Morfina	5,0 (i.p.) (7)	24,7±2,5***	6,85±1,89***	53	79
Naloxona	2,0 (i.p.) (7)	59,7±2,13	28,5±1,55	-	-
Naloxona + Morfina	2,0+5,0 (i.p.) (9)	69,71±1,98	23,2±2,38	-	-
Naloxona + Lectina	2,0+5,0 (i.p.) (9)	64,6±2,19	39,4±2,36	-	-

Valores representam média ± E.P.M.

*** P<0,001 Student-Newman-Keuls Method (comparado ao grupo controle)

() número de animais por grupo

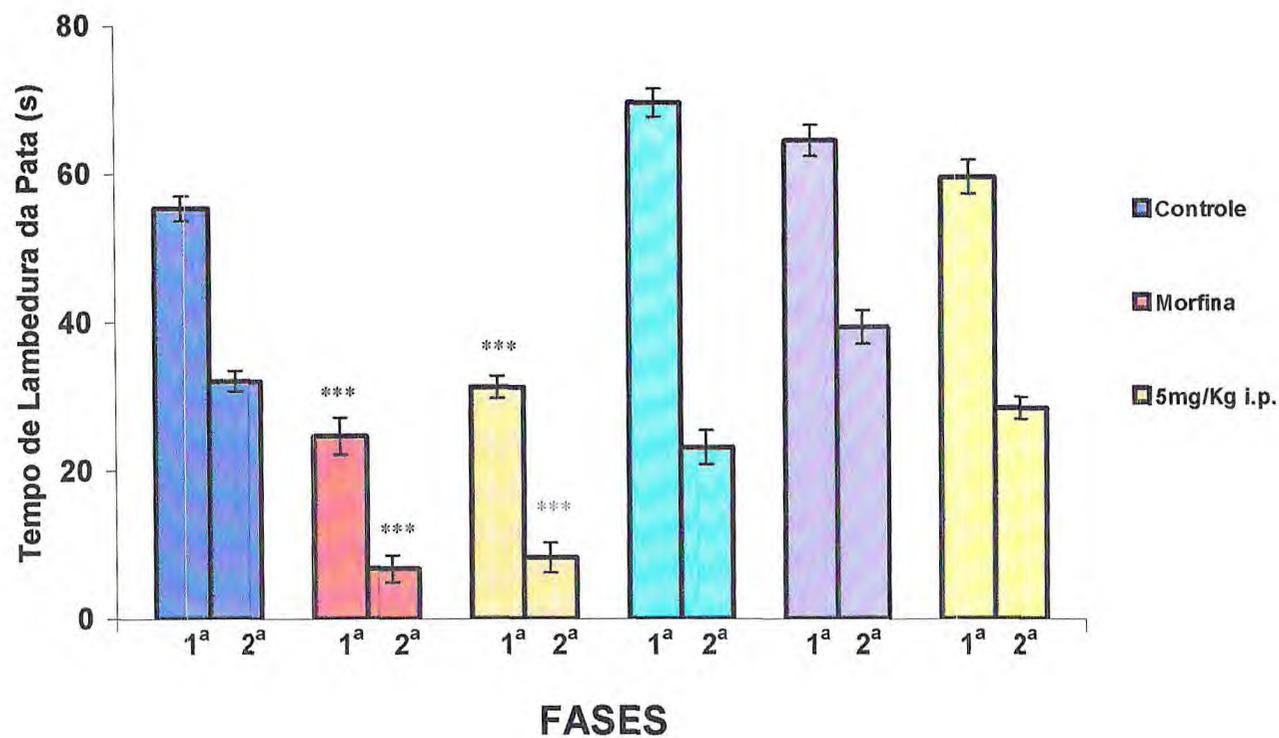


FIGURA 26: Estudo do envolvimento do sistema opióide na antinocicepção pela lectina de *Meristiella echinocarpa* no teste de formalina em camundongos. *** P<0,001 comparado ao grupo controle (Student Newman-Keuls Method).

dor e analgesia. Os analgésicos de ação central como a morfina, inibem as duas fases, enquanto que drogas de ação periférica como os antiinflamatórios e corticóides inibem somente a segunda fase (HUNSKAAR e HOLE , 1987; SHIBATA et al., 1989).

As lectinas de *B. triquetrum* e *B. seaforthii*, mostraram um efeito inibitório do tempo de lambedura da pata mais intenso na segunda fase, em todas as concentrações testadas. A naloxona foi capaz de reverter o resultado obtido com as lectinas de BS e BT (VIANA et al., 2002). O mesmo foi observado com a lectina de *Amansia multifida* (NEVES , 2005).

No teste de formalina, a lectina de *M. echinocarpa*, diminuiu o tempo de lambedura da pata nas duas fases do teste, tanto no tratamento intraperitoneal como oral, mostrando que esta lectina interfere tanto na estimulação química dos nociceptores na primeira fase, como tem um efeito relacionado com a inibição inflamatória. A naloxona, um antagonista opióide, que reverte o efeito de drogas analgésicas opióides, como a morfina, também exerceu influência sobre o efeito da lectina, abolindo sua atividade analgésica. Esses dados sugerem que o efeito antinociceptivo da lectina de *M. echinocarpa* parece envolver a atividade de receptores opióides.

5. CONCLUSÕES

- ✓ A lectina de *Meristiella echinocarpa* têm efeito antiedematogênico significativo no modelo de edema de pata induzido por carragenina e dextrano, em camundongos.
- ✓ Foi observado também atividade analgésica nos modelos de contorções abdominais com ácido acético a 0,6 % e formalina, em camundongos. A analgesia provocada pela lectina, no modelo de formalina, foi revertida com naloxona, mostrando a participação dos receptores opióides nesse efeito.
- ✓ Os tratamentos induzidos por via intraperitoneal, mostraram melhores resultados que os obtidos por via oral, possivelmente devido à metabolização enzimática do componente ativo por enzimas digestivas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, M. C. H. **Estudos farmacológicos em algas marinhas: aplicação das lectinas *Bryothamnion seaforthii* (Turner) Kutz e *Bryothamnion triquetrum* (s. G. Gmel) M. Howe como drogas analgésicas.** Dissertação de Mestrado em Bioquímica. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 97 p., 1999.
- ANEIROS, A.; GARATEIX, A. Bioactive peptides from marine sources: pharmacological properties and isolation procedures. **Journal of Chromatography**, **803**: 41-53, 2004.
- ASONGALEM, E. A.; FOYET, H. S.; EKOBO, S.; DIMO, T.; KAMTCHOUING, P. Antiinflammatory, lack of central analgesia and antipyretic properties of *Acanthus montanus* (Ness) T. Anderson. **Journal of Ethnopharmacology** **95**: 63-68, 2004.
- BASTOS, G. N. T.; SANTOS, A. R. S.; FERREIRA, V. M. M.; COSTA, A. M. R.; BISPO, C. I.; SILVEIRA, A. J. A.; DO NASCIMENTO, J. L. M. Antinociceptive effect of the aqueous extract obtained from roots of *Physalis angulata* L. on mice. **Journal of Ethnopharmacology** **103**: 241-245, 2006.
- BENYHE, S. Morphine: new aspects in the study of na ancient compound. **Life Sci** **55**: 969-979, 1994.
- BESSION, J. M.; The neurobiology of pain. **Lancet** **353**: 1610-1615, 1999. Citado por CALIXTO, J. B. et al., 2000.
- BRAGGIO, M. M.; LIMA, M. E. L.; VEASEY, E. A.; HARAGUCHI, M. Atividades farmacológicas das Folhas da *Sesbania virgata* (CAV.) Pers. **Arquivo do Instituto de Biologia, São Paulo**, v. **69**, n. 4, p. 49-53, 2002.
- CALIXTO, J. B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; FILHO, V.; YUNES, R. A. Naturally Occurring Antinociceptive Substances from Plants. **Phytotherapy Research**, **14**: 401-418, 2000.
- COLLIER, H. D. J.; DINNIN, L. C.; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal response and its supression by analgesic drugs in the mouse. **Br J Pharmacol**; **32**: 295-310, 1968. Citado por: DO MONTE et al., 2004.
- DAMAS, J.; REMACLE-VALON, G. Influence of a long-acting bradykinin antagonist, Hoe 140, on some acute inflammatory reactions in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, v. **211**, p. 81-86, 1992.
- DE SMET, P. A. G. M. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. **Drugs** **54**: 801-840, 1997. Citado por CALIXTO, J. B. et al., 2000.
- DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J. Path.** v. **104**, p. 15-29, 1971. Citado por: SOUSA et al., 2005.

DO MONTE, F. H. M.; SANTOS Jr.; J. G., RUSSI, M.; LANZIOTTI, V. M. N. B.; LEAL, L. K. A. M.; CUNHA, G. M. A. C. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of the hydroalcoholic extract of stems from *Equisetum arvense* L. in mice. **Pharmacological Research** **49**: 239-243, 2004.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic affects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**. v. **21**, p. 161-174, 1977.

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

GADOTTI, V. M. **Estudo do mecanismo de ação antinociceptiva da agmatina em camundongos**. Mestrado em Neurociências. Curso de Pós-Graduação em Neurociências. Universidade Federal de Santa catarina, 95 p., 2005.

GARDNER, D. L. Adjuvant induced arthrits in the rats. **Ann Rheumatism Dis**, v. **19**, p. 369, 1960. Citado por: NETO et al., 2004.

HENDERSHOT, L. C.; FORSAITH, J. Antagonism of the frequency of phenylquinone-induced writhing in the mouse by weak analgesics and non analgesics. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. **125**, p. 237-240, 1959. Citado por BRAGGIO et al., 2002.

HOLANDER, C.; NYSTROM, M.; JANCIAUSKIENE, S.; WESTIN, U. Humam mast cells decrease SLPI levels in type II-like alveolar cell model *in vitro*. **Cancer Cell International** **3**: 14-22, 2003.

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

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and noninflammatory pain. **Pain**. **30**: 103-104, 1987. Citado por VALE, T. G., 1999.

IRELAND, C. M.; COPP, B. R.; FOSTER, M. P.; McDONALD, L. A.; RADISKY, D. C.; RADISKY, D. C.; SWERSEY, J. C. Biochemical potential of marine natural products, 1993. Citado por: SMIT, 2004.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**. **413**: 203-210, 2001.

KATSUHIKO, Y.; TAKASHI, M. Comparison on the anti-inflammatory effects of dexametasone, indometacin and 8W755 on carrageenin-induced pleurisy in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, **77**: 229-236, 1982.

KATZ, L. B.; THEOBALD, H. D.; BOOKSTAFF, R. C. Characterization of the enhanced paw edema response to carrageenan and dextran in 2, 3, 7, 8,-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-treated rats. **Journal Pharmacol Exp Ther**, **230**: 670-677, 1984.

- KELECOM, A. Secondary metabolites from marine microorganisms. **Annual Acad. Bras. Cienc.** **74**: 151-170, 2002.
- KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed Proc.** v. **18**, p. 412-417, 1959.
- LIM, S. N.; CHEUNG, P. C.; OOI, V. E.; ANG, P. O. Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed *Sargassum siliquastrum*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, **50**: 3862-3866, 2002.
- LO, T. N.; ALMEIDA, A. P.; BEAVEN, M. A. Dextran and carrageenan evoke different inflammatory response in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **Journal Pharmacol Exp Ther**, **221**: 261-267, 1982. Citado por SOUSA et al., 2005.
- LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet** **353**: 1607-1609, 1999.
- MASFERRER, J. L.; ZWEIFEL, B. S.; MANNING, P. T.; HAUSER, S. D.; LEAHY, K. M.; SMITH, W. G.; ISAKSON, P. C.; SEIBERT, K. Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 *in vivo* is antiinflammatory and nonulcerogenic. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **91**: 3228-3232, 1994.
- MAYER, A. M. S.; LEHMANN, V. K. B. Marine pharmacology in 1998: marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, anthelmintic, antiplatelet, antiprotozoal, and antiviral activities; with actions on the cardiovascular, endocrine, immune, and nervous systems; and other miscellaneous mechanisms of action. **Pharmacologist**, **42**: 62-69, 2000.
- MAYER, A. M. S.; HÁMANN, M. T. Marine pharmacology in 1998: compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anthelmintic, anti-inflammatory, antiplatelet, antiprotozoal, and antiviral activities affecting the cardiovascular, endocrine, immune, and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** **132**: 315-339, 2002.
- MERSKEY, H.; BOGDUK, N. **Classification of Chronic pain**. IASP Press: Seattle; 209-214, 1994.
- MILLAN, M. J. The induction of pain: na integrative review. **Prog Neurobiol.** **57**: 1-164, 1999. Citado por CALIXTO, J. B. et al., 2000.
- MURRAY, C. W.; PORRECA, F.; COWAN, A. Methodological refinements to the mouse paw formalin test. An animal model of tonic pain. **Journal of Pharmacological Methods**, **20**: 175-186, 1988. Citado por SOARES et al., 2005.
- NETO, J. A. P.; PERAZZO, F. F.; CARDOSO, L. G. V.; BONAMIN, L. V.; CARVALHO, J. C. T. Action of *Causticum* in inflammatory models. **Homeopathy**, **93**: 12-16, 2004.

- NEVES, S. A. **Lectina de *Amansia multifida* Lamouroux: especificidade fina por açúcares e ação farmacológica.** Tese de Doutorado em Bioquímica. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 154 p., 2005.
- OKAMOTO, L.; IMBR, H.; TASHIRO, A.; KUMABE, S.; SENBA, E. Blockade of peripheral 5HT₃ receptor attenuates the formalin-induced nocifensive behavior in persistent temporomandibular joint inflammation of rat. **Neuroscience Letters** **367**: 259-263, 2004.
- OMISORE, N. O. A.; ADEWUNMI, C. O.; IWALEWA, E. O.; NGADJUI, B. T.; WATCHUENG, J.; ABEGAZ, B. M.; OJEWOLE, J. A. O. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Dorstenia barteri* (Moraceae) leaf and twig extracts in mice. **Journal of Ethnopharmacology** **95**: 7-12, 2004.
- PAYAN, D. G.; KATZUNG, B. G. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs; Nonopioid analgesics; Drug used in gout. In: Katzung, B. G. **Basic & Clinical Pharmacology**. 6th ed. East Norwalk: Appleton & Lange. 1995 p. 552. Acesso em: 14 de março de 2005.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**, 5^a ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 904 pp., 2004.
- RONALD, M. B.; CHRISTOPHER, D. H. A bradykinin antagonist inhibits carrageenan edema in rats. **Arch. Pharmacol.**, v. **342**, p. 189-193, 1990.
- SANTOS, A.R. S.; VEDANA, E. M. A.; FREITAS, G. A. G. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. **Inflammation Research** **47**: 302-307, 1998. Citado por: BASTOS et al., 2006.
- SEIBERT, K.; ZHANG, Y.; LEAHY, K.; HAUSER, S.; MASFERRER, J.; PERKINS, W.; LEE, L.; ISAKSON, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, **91**: 12013-12017, 1994.
- SILBERNAGL, S.; LANG, F. Atlas de Poche de Physiopathologie. **Médecine-Sciences**, 1^a ed., Flammarion, pp. 20-21, 320-321, 2000. Citado por: ASONGALEM et al., 2004.
- SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characterization biphasic pain response. **Pain**, **38**: 347-352, 1989.
- SHU, H. H.; TSENG, L. F. Different types of opioid receptors mediating analgesia induced by morphine, DAMGO, DPDPE, DADLE and β -endorphin in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol** **34**: 67-71, 1999. Citado por CALIXTO, J. B. et al., 2000.
- SMIT, A. J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. **Journal of Applied Phycology** **16**: 245-262, 2004.

- SOARES, P. M.; LIMA, S. R.; MATOS, S. G.; ANDRADE, M. M.; PATROCÍNIO, M. C. A.; FREITAS, C. D. T.; RAMOS, M. V.; CRIDDLE, D. N.; CARDI, B. A.; CARVALHO, K. M.; ASSREUY, A. M. S.; VASCONCELOS, S. M. M. Antinociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. **Journal of Ethnopharmacology** **99**: 125-129, 2005.
- SOUSA, P. J. C.; ROCHA, J. C. S.; PESSOA, A. M.; ALVES, L. A. D.; CARVALHO, J. C. T. Estudo preliminar da atividade antiinflamatória de *Bryophyllum calycinum* Salisb. **Revista Brasileira de Farmacognosia** **15 (1)**: 60-64, 2005.
- TAKAHASHI, R. N. e PAZ, M. M. Influence of naloxone on analgesic effects of antidepressants in mice. **Braz. J. Med. Res.**, v. **20**, p. 607-610, 1987.
- TJOLSEN, A.; HOLE K. Animal models of analgesia, 1997. In: Dickenson A.; Besson, J.; -M.; aditors. **The Pharmacology of Pain**. Vol.130/I., Springer: Verlag, Berlin, 1-20. Citado por GADOTTI, 2005.
- TREASE, G. E.; EVANS, W. C. In Pharmacognosy. Bailliére Tindall; London: 527-620, 1978. Citado por CALIXTO, J. B. et al, 2000.
- TUBARO, A.; DRI, P. DELBELLO, G.; ZILLI, C.; DELLA LOGGIA, R. The croton oil test revisited. **Agents and Actions**, **17** : 347-349, 1985.
- VALE, T. G. **Estudo Farmacológico Comparativo de Óleos Essenciais de quimiotipos de Lippia Alba (Mill.) N. E. Brown**. Dissertação de Mestrado. Departamento de Farmacologia. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 121 p., 1999.
- VANDER, W. C.; MARGOLIN, S. Analgesic test based upon experimentally induced acute abdominal pain in rats. **Fed Proc.** v. **15**, p. 494, 1956.
- VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, **38**: 97-120, 1998.
- VÁZQUEZ-FREIRE, M. J.; CASTRO, E.; LAMELA, M.; CALLEJA, M. Neuropharmacological Effects of *Cystoseira usneoides* Extract. **Phytotherapy Research**, **9**: 207-210, 1995.
- VÁZQUEZ-FREIRE, M. J.; LAMELA, M.; CALLEJA, M. *Laminaria ochroleuca*: A Preliminary Study of its Effect on the Central Nervous System. **Phytotherapy Research**, **8**: 422-425, 1994.
- VIANA, G. S. B.; FREITAS, A. L. P.; LIMA, M. M. L.; VIEIRA, L. A. P.; ANDRADE, M. C. H.; BENEVIDES, N. M. B. 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**, **35**: 713-722, 2002.
- VIEIRA, L. A. P.; FREITAS, A. L. P.; FEITOSA, J. P. A.; SILVA, D. C.; VIANA, G. S. B. The algae *Bryothamnion seaforthii* contains carbohydrates with antinociceptive

activity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **37**: 1071-1079, 2004.

VIEIRA, L. A. P. **Estudos Bioquímicos e Farmacológicos das Algas *Bryothamnion saforthii* (Turner), *Bryothamnion triquetrum* (S. G. Gmel) M. Howe e *Botryocladia occidentalis* (Borgesen) Kylin**. Dissertação de Mestrado em Bioquímica. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 160 p., 2002.

VIEIRA, L. A. P.; ANDRADE, M. C. H.; BASTOS, M. V. R.; FREITAS, A. L. P.; VIANA, G. S. B. Efeito analgésico periférico e central da lectina de *Bryothamnion saforthii* Kütz. **XIV Anual Meeting of the Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, Caxambu, Mg, Brazil, August 25-28, 1999.

VINGER, R.; TRUAX, J. F.; SELPH, J.L.; JOHNSTON, P. R.; VENABLE, A. L.; MCKENZIE, R. K. Pathway to carrageenan-induced inflammation in the limb of rat. **Fed. Proc.**, **46**: 118-126, 1987.

WINTER, C. A.; RISELY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenan-induced edema in the hind paw of the rat as na assay for anti-inflammatory drugs. **Proc Soc Exp Biol Med**. v. **111**, p. 544-547, 1962.

YEH, S. Y. Potentiation of pentazocine antinociception by tripeleennamine in the rat. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. **235**, p. 683-689, 1985.