

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UFC
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA**

LUCIANA BRANDÃO PAIM

**AÇÃO ANTIINFLAMATÓRIA DA LECTINA DE SEMENTE DE *DIOCLEA*
VIOLACEA NA ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN**

**FORTALEZA
2006**

LUCIANA BRANDÃO PAIM

**AÇÃO ANTIINFLAMATÓRIA DA LECTINA DE SEMENTE DE *DIOCLEA*
VIOLACEA NA ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Clínica Médica.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha

**FORTALEZA
2006**

**AÇÃO ANTIINFLAMATÓRIA DA LECTINA DE SEMENTE DE *DIOCLEA*
VIOLACEA NA ARTRITE INDUZIDA POR ZYMOSAN**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Clínica Médica.

Aprovada em 06/07/2006

BANCA EXAMINADORA

José Júlio Costa Sidrim
Universidade Federal do Ceará - UFC

Maria Helena da Silva Pitombeira
Universidade Federal do Ceará - UFC

Lílian Maria Carneiro Câmara
Universidade Federal do Ceará - UFC

A Deus, que me guiou todos os dias de minha vida e trouxe-me ao convívio de pessoas boas e ao exercício da profissão a qual nasci para exercer.

Aos meus pais pela luta diária pela nossa educação, pelo exemplo de profissionais e por todo amor a nós dedicado.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me guia e impulsiona a cada dia, mostrando sempre o caminho a seguir

Aos meus pais, José Luiz Paim e Maria Lúcia Brandão Paim, que além de amor e confiança, souberam me ensinar a andar com minhas próprias pernas, porém sem nunca me sentir só

A minha irmã, Fabiana Paim, pelo companheirismo, admiração e amor que sentimos uma pela outra

Ao meu companheiro de vida, Luiz Otávio pelo amor incondicional e o apoio em todas as horas

Ao meu orientador, Dr. Francisco Airton Castro da Rocha, pelo brilhantismo de idéias, pela coerência de ações, pela acolhida em seu laboratório, pela paciência e compreensão. Principalmente, por ser um grande ser humano e aceitar esta condição nos outros

Ao Professor Benildo Cavada, que desde a minha graduação, foi um dos maiores responsáveis pela minha formação em pesquisa. Agradeço a atenção e a amizade, qualidades inerentes à sua pessoa.

À minha nova amiga e companheira de LIO, Ana Carolina (Carol) Melo, por seu companheirismo, pela sua generosidade para com os colegas, pelas horas divertidas de experimentos (por rir das minhas besteiras) e pela sua colaboração fundamental para a realização desta tese. Que a vida lhe traga sempre o que há de melhor

Às colegas e amigas Glorinha e Marcela, pelos momentos agradáveis no laboratório e pelo apoio incondicional

Às amigas do laboratório, Patrícia, Isabele, pela contribuição na realização desse trabalho

Aos caros amigos do laboratório, Rondinelle, Saraiva, Marcus e Bruno, pelo respeito e pela amizade conquistada a cada dia

Aos professores da pós-graduação, pelos conhecimentos transmitidos

A Geane e ao Anaézio, pelos serviços prestados ao LIO, sempre solícitos e amigos

Aos Colegas de trabalho no Centro de Saúde de Messejana pela compreensão e calorosa acolhida. Ser respeitada e bem quista no ambiente de trabalho é fundamental para o bom desempenho da minha profissão

A Dona Guilhermina (Colégio Angélica Gurgel) pelo carinho e apoio durante a execução da tese

Aos meus lindos sobrinhos Gabriel, Mariana por me mostrarem a cada dia a maravilha da descoberta

*"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."*

Bertolt Brecht

RESUMO

Lectinas de origem vegetal inibem quimiotaxia neutrofilica, provavelmente por ação competitiva com selectinas endógenas por um sítio glicosídico na membrana de células endoteliais, leucócitos ou em componentes da matrix extracelular. Exploramos os efeitos de lectina isolada de sementes de *Dioclea violacea* (Dviol) na artrite induzida por zymosan (Zy). Ratos Wistar (180 a 220g) receberam injeção intra-articular (i.a.) de zymosan (Zy) (1mg) no joelho direito. A hiperalgesia foi avaliada pelo teste de incapacitação articular, medido pelo tempo de suspensão da pata (TSP) em s/min. O influxo celular (IC) foi medido no lavado articular, obtido 6 h após a injeção do Zy, por lavagem e aspiração da articulação. Grupos foram pré-tratados (30 min) antes do Zy com Dviol (1 - 30 µg; i.a. ou 1 - 10mg/kg; e.v.), sendo comparados ao grupo não-tratado (NT), que recebeu apenas Zy e o veículo. Outros grupos receberam apenas Dviol (0,3- 30 µg) i.a. e o grupo Naive, apenas salina i.a. A administração de Dviol (6mg/kg; e.v.), reduziu significativamente ($p < 0,01$) a hiperalgesia (TSP= $14,08 \pm 1,4$) quando comparado ao NT (TSP= $36,06 \pm 3,3$). A injeção endovenosa de Dviol inibiu o IC ($18.266,7 \pm 1.890,1$; $14.633,3 \pm 3.207,2$; $2.790 \pm 503,3$ e $120 \pm 37,4$ células/mm³ para 1, 3, 6 e 10mg de Dviol, respectivamente) quando comparados ao NT ($37.583,3 \pm 6.007,2$ células/mm³). A administração i.a. de apenas Dviol (30µg) aumentou significativamente o TSP ($15,5 \pm 0,9$), em relação ao NV. Dviol i.a. isolada (0,3 a 30; µg), aumentou significativamente o IC (3.600 ± 676 ; $4.958,3 \pm 1037,2$ e $8.350 \pm 1.511,5$ células/mm³ para lectina 0,3; 3 e 30, respectivamente), comparado ao NV ($858,3 \pm 389,5$ células/mm³). Dviol (10 µg; i.a.), 30 min antes da injeção do Zy, inibiu significativamente a hiperalgesia (TSP = $20,15 \pm 2,2$) ($p < 0,01$), em relação ao NT (TSP= $35,9 \pm 2,7$). Dviol i.a. (1, 10 e 30µg) reduziu significativamente o IC ($18.266,7 \pm 1.890,1$; $11.366,7 \pm 2.883,7$ e $19.866,7 \pm 1.783,4$ células/mm³, respectivamente), comparado ao NT. A administração e.v. de Dviol (6 mg/kg) + manose (0,1M), reverteu a inibição da Dviol na hiperalgesia (TSP= $38,4 \pm 4,4$) ($P < 0,01$) e no IC ($15200 \pm 1829,7$ células/mm³) da AZy, em relação a Dviol (6mg/kg;e.v.) (TSP= $14,08 \pm 1,4$ e IC= $2.790 \pm 503,3$ células/mm³). Os resultados demonstram, de maneira inédita, que a lectina de semente de Dviol tem ação antiinflamatória em artrite experimental. Esse efeito parece ser prioritariamente associado à ligação da Dviol a sítios de polissacarídeos intra-articulares, embora não possamos descartar que a ligação a domínios protéicos possa estar envolvida nessa ação.

Palavras-chaves: Artrite Experimental, zymosan, Lectina, *Dioclea violacea*.

ABSTRACT

Plant-derived lectins inhibit neutrophil chemotaxis, probably through a competitive mechanism with endogenous selectins for a glycosidic residue in the membrane of endothelial cells, leukocytes or in components of the extracellular matrix. We investigated the effects of a lectin isolated from *Dioclea violacea* (Dviol) seeds in the zymosan-induced arthritis (Azy). Wistar rats (180 a 220g) received an intraarticular (i.a.) injection of 1 mg zymosan (Zy) into the right knee. The hyperalgesia was evaluated with the test for articular incapacitation, measured as the paw elevation time (PET) in s/1min. Cell influx (IC) was assessed in the joint exudate, obtained 6 h after injection of the Zy, through washing and aspiration of the joint. Groups were pretreated 30min before the Zy with Dviol (1 - 30 μ g; i.a. ou 1 - 10mg/kg; e.v.), and were compared to non-treated groups (NT), that received the Zy and the vehicle. Others groups received only Dviol (0,3 - 30 μ g; i.a. and the naïve animals (NV) received just saline i.a. The i.v. administration of Dviol (6mg/kg) significantly reduced the hyperalgesia ($p < 0.01$) (PET= $14,08 \pm 1,4$) as compared to NT (PET= $36,06 \pm 3,3$). The i.v. injection of Dviol inhibited IC ($18.266,7 \pm 1.890,1$; $14.633,3 \pm 3.207,2$; $2.790 \pm 503,3$ e $120 \pm 37,4$ cells/mm³ for the 1, 3, 6, and 10mg doses of Dviol, respectively). Dviol given i.a. isolated (30 μ g) increased PET ($15,5 \pm 0,9$) significantly, as compared to NV. Dviol i.a. isolated (0,3 - 30 μ g) significantly increased IC (3.600 ± 676 ; $4.958,3 \pm 1037,2$ e $8.350 \pm 1.511,5$ cells/mm³ for 0,3, 3 e 30 μ g, respectively), as compared to NV ($858,3 \pm 389,5$ cells/mm³). Dviol (10 μ g i.a.) given 30min before the Zy significantly inhibited the hyperalgesia (PET = $20,15 \pm 2,2$) ($p < 0.01$), as compared to NT (TSP= $9,9 \pm 1,2$). Dviol i.a. (1, 10, and 30 μ g) significantly reduced IC ($18.266,7 \pm 1.890,1$; $11.366,7 \pm 2.883,7$ e $19.866,7 \pm 1.783,4$ cells/mm³, respectively), as compared to NT. The i.v. administration of Dviol (6 mg/kg) + manose reversed the inhibitory action of Dviol in the hyperalgesia (PET= $38,4 \pm 4,4$) ($P < 0.01$) and in the IC ($15200 \pm 1829,7$ cells/mm³) of the AZy, as compared to Dviol (6mg/kg; i.v.) (TEP= $14,08 \pm 1,4$ and IC= $2.790 \pm 503,3$ cells/mm³). The results demonstrate, for the first time, that the lectin isolated from Dviol has anti-inflammatory effect in an experimental arthritis model. This effect appears to be prominently due to the coupling of Dviol to intrarticular polysaccharide residues. However, we can not exclude that coupling to protein residues may be also involved in this mechanism.

Key-words: Experimental Arthritis, zymosan, Lectins, *Dioclea violacea*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Tetrâmero da subtribo das <i>Diocleinae</i> . Imagem tridimensional.	19
FIGURA 2 - Tetrâmero da subtribo das <i>Diocleinae</i> . Imagem tridimensional.	19
FIGURA 3 Sistema utilizado para medir a incapacitação articular (IA) dos animais submetidos á artrite induzida por zymosan (AZy).	22
FIGURA 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de 2-mercaptoetanol e de SDS da lectina purificada de sementes <i>Dioclea violacea</i> .	28
FIGURA 5 – Encaixe da Sapatilha na pata do animal	32
FIGURA 6 - Animal no sistema de incapacitação articular (IA) com a sapatilha	32
FIGURA 7 - Efeito do zymosan sobre a incapacitação articular na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos.	34
FIGURA 8 - Efeito do zymosan sobre o influxo celular na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos	35
FIGURA 9 - Efeito da administração endovenosa (e.v.) da <i>Dioclea violacea</i> sobre a incapacitação articular na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos.	37
FIGURA 10 - Efeito dose-dependente da administração endovenosa (e.v.) da <i>Dioclea violacea</i> (Dviol) sobre o influxo celular na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos	38
FIGURA 11 - Efeito da administração intra-articular (i.a.) da <i>Dioclea violacea</i> (Dviol) em ratos.	39
FIGURA 12 - Efeito da administração intra-articular (i.a.) da <i>Dioclea violacea</i> (Dviol) sobre o influxo celular em ratos	40
FIGURA 13 - Efeito da administração intra-articular (i.a.) da <i>Dioclea violacea</i> (Dviol) sobre a incapacitação articular na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos	41
FIGURA 14 - Efeito da administração intra-articular (i.a.) da <i>Dioclea violacea</i> (Dviol) sobre o influxo celular na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos	42
FIGURA 15 - Reversão do efeito da <i>Dioclea violacea</i> (Dviol) endovenosa sobre a incapacitação articular, pela administração de manose, na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos.	43
FIGURA 16 - Reversão do efeito da <i>Dioclea violacea</i> (Dviol) endovenosa sobre o influxo celular, pela administração de manose, na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos.	44

LISTA DE ABREVIATURAS

AR - Artrite Reumatóide

Dviol – *Dioclea violacea*

NAIVE - NV

Con A – *Concanavalina A*

Com Br – *Canavalia brasilienses*

DGL- *Dioclea grandiflora*

Zy - Zymosan

AZy - Artrite Induzida por Zymosan

IA - Incapacitação Articular

TSP – Tempo de suspensão da pata

MBL (Manose binding lectins) - Lectina Ligadora de Manose

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

LES – Lupus Eritematoso Sistêmico

fMLP - N-formil-metionil-leucil-fenilalanina

UFC – Universidade Federal do Ceará

NaCl – Cloreto de sódio

M – Molar

g – Giros

BIOLMOL – Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC

i.a. - Via Intra-articular

IC - Influxo Celular

i.p. - Via Intra-peritoneal

NO - Óxido Nítrico

s.c. - Via Subcutânea

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral α

e.v. – Endovenoso

NT – Grupo Não -Tratado

ADA - adenosina deaminase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Artrite Reumatóide (AR)	14
1.2. Modelos Experimentais de Artrites	14
1.3. Lectinas	15
1.4. Modelo de artrite induzida por zymosan (AZy)	20
1.5. Lectinas ligadoras de manose (MBL):	23
2. Objetivos	26
2.1. Objetivos Secundários	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Lectina <i>Dioclea violacea</i> (Dviol)	27
3.2. Animais	29
3.3. Soluções, drogas e reagentes	29
3.3.1. Reagentes	29
3.3.2. Co-incubação da manose com a <i>Dioclea violacea</i>	30
3.4. Protocolo experimental	30
3.4.1. Indução da artrite por zymosan (AZy)	30
3.4.2. Análise da incapacitação articular (IA)	30
3.4.3. Coleta do lavado articular	30
3.4.4. Análise da celularidade do lavado articular	31
3.5. Tratamento dos animais com lectina <i>Dioclea violacea</i>	33
3.5.1. Lectina <i>Dioclea violacea</i> endovenosa (e.v.)	33
3.5.2. Lectina <i>Dioclea violacea</i> intra-articular (i.a.)	33
3.6. Análise estatística	33
4. RESULTADOS	34
4.1. Efeito do zymosan sobre a incapacitação articular em ratos submetidos à artrite induzida por zymosan (AZy)	34
4.2. Efeito do zymosan sobre o influxo celular em ratos submetidos à artrite induzida por zymosan (AZy)	35
4.3. Efeito da administração endovenosa (e.v.) da <i>Dioclea violacea</i> (Dviol) sobre a incapacitação articular na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos	36
4.4. Efeito dose-dependente da administração endovenosa (e.v.) da <i>Dioclea violacea</i> (Dviol) sobre o influxo celular na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos	38
4.5. Efeito da administração intra-articular (i.a.) da <i>Dioclea violacea</i> (Dviol) sobre a incapacitação articular em ratos	39
4.6. Efeito da administração intra-articular (i.a.) da <i>Dioclea violacea</i> (Dviol) sobre o influxo celular em ratos	40
4.7. Efeito da administração intra-articular (i.a.) da <i>Dioclea violacea</i> (Dviol) sobre a incapacitação articular na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos	41
4.8. Efeito da administração intra-articular (i.a.) da <i>Dioclea violacea</i> (Dviol) sobre o influxo celular na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos	42
4.9. Reversão do efeito da <i>Dioclea violacea</i> (Dviol) endovenosa sobre a incapacitação articular, pela administração de manose, na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos	43

5.0. Reversão do efeito da <i>Dioclea violacea</i> (Dviol) endovenosa sobre o influxo celular, pela administração de manose, na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos	44
6.0. Discussão	45
7.0. Conclusões	51
8.0. Referências	52

1. INTRODUÇÃO

1.1. Artrite reumatóide (AR)

A AR é uma doença universal, com prevalência entre 0,5 e 1,0% na população adulta; porém, esse valor aumenta para 4,5%, considerando-se a população entre 55 e 75 anos de idade (HARRIS, 1990).

Os sinais e sintomas do processo inflamatório articular são máximos no início do quadro e as erosões ocorrem, predominantemente, nos dois primeiros anos de doença.

A artrite reumatóide acomete primariamente a membrana sinovial com destruição da cartilagem articular e invasão do osso subcondral, com características de um processo inflamatório crônico. Dentre os inúmeros fatores envolvidos na etiopatogenia, acredita-se que um estímulo antigênico inicie o processo em indivíduos geneticamente predispostos e em condições ambientais favoráveis. Assim, a sinovite reumatóide seria, de início, uma resposta imunológica específica dirigida contra esse antígeno ainda não identificado, perpetuando-se por meio da produção local de mediadores inflamatórios (HARRIS, 1990).

A maioria dos pacientes com artrite reumatóide sofre uma deterioração significativa na sua capacidade funcional, de maneira que mais de 50% dos indivíduos afetados apresentam dificuldades no desempenho das atividades profissionais, após 10 anos de doença. Além desse aspecto de morbidade, a sobrevivência dos portadores de AR é 20% menor quando comparada à população normal e a mortalidade aumenta em relação direta com a gravidade da artrite (MYLLYKANGAS-LUOSUJAJÄRVI et al., 1995).

1.2. Modelos experimentais de artrite:

Os modelos experimentais de artrite são de fundamental importância na observação da patologia e no estudo da sua fisiopatologia. Os modelos atuais de artrite reproduzem aspectos clínicos e anátomo-patológicos da doença humana, incluindo migração de células inflamatórias, edema sinovial,

hiperplasia da sinóvia, angiogênese, linfoproliferação e lesão da cartilagem articular. Em alguns modelos, aspectos de auto-imunidade, à semelhança do relatado na artrite reumatóide, foram relatados, como a presença de fator reumatóide.

Dentre os modelos experimentais de estudo da artrite reumatóide, podem ser citados: **artrite induzida por antígeno** - realiza-se por sensibilização prévia do animal a um antígeno, habitualmente a ovalbumina é utilizada, e posterior indução da artrite por injeção intra-articular da substância antigênica (DUMONDE e GLYNN, 1962), **artrite induzida por adjuvante** - induzida por injeção intradérmica de suspensão em óleo de *Mycobacterium tuberculosis* mortos pelo calor – adjuvante completo de Freund (CHANG et al., 1980), **artrite induzida por imunocomplexos** - consiste em uma reação de Arthus passiva reversa, pela injeção intra-articular de um anticorpo (p.ex: anti-soro albumina bovina), seguida de injeção sistêmica do respectivo antígeno (soro albumina bovina) (ROCHA et al., 1997) e a **artrite induzida por colágeno** – reação desencadeada por injeção intradérmica de colágeno tipo II emulsificado em adjuvante incompleto de Freund (HEYMER, 1982).

1.3. Lectinas:

Lectinas, também chamadas aglutininas ou fitohemaglutininas, foram inicialmente descritas em 1888 e achava-se que eram substâncias tóxicas. Posteriormente, depois de descoberta suas estruturas e de suas afinidades biológicas, mudanças na nomenclatura ocorreram: hemaglutininas (por exibir uma clara preferência por eritrócitos), proteínas com capacidade aglutinante, já que não aglutinam somente eritrócitos, mas também outros tipos de células e, finalmente, proteínas que se ligam a carboidratos, a qual foi baseada primariamente na especificidade ao açúcar e na inibição da reação de aglutinação. Assim, elas são proteínas ligadoras de carboidratos (ou glicoproteínas) de origem não imune que aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados (GOLDSTEIN et al., 1980).

Lectinas são uma classe estruturalmente muito diversificada de proteínas ligadoras de carboidratos, as quais estão presentes em plantas, animais e até microorganismos (DANGUY et al., 2002).

Atualmente, uma lectina de planta pode ser definida como toda proteína de planta que possua pelo menos um domínio não catalítico que se liga específica e reversivelmente a um mono ou oligossacarídeo (PEUMANS e VAN DAMME, 1995) e seja capaz de mediar inúmeros efeitos biológicos, incluindo liberação de histamina, estimulação de linfócitos humanos e aglutinação seletiva de eritrócitos (ASSEURY et al., 1997).

As lectinas vegetais serão o alvo do nosso estudo, tendo a lectina purificada de sementes de *Dioclea violacea* como escolha (MOREIRA et al., 1996). A sua maior característica é a habilidade de se ligar a carboidratos específicos e, então, se combinar a moléculas ou estruturas moleculares que contêm esses açúcares (MOREIRA et al., 1991); com isso, elas participam de inúmeros processos celulares, tais como: comunicação entre células, autodefesa, fertilização e desenvolvimento, infecção parasitária, tumores metastáticos, inflamação, etc (BARBOSA et al., 2001). Em contraste, e apesar da sua abundância em plantas, as lectinas vegetais estão sendo estudadas, assim suas verdadeiras funções fisiológicas ainda não estão totalmente definidas.

Acredita-se que uma das principais funções das lectinas vegetal seja, em condições normais, a de estocagem de proteína e, quando a planta é ingerida e a lectina é absorvida pelo trato gastrintestinal, age como uma proteína de defesa causando sensações de náuseas e vômitos no predador que, em seguida, evitará ingerir-la. São observados também efeitos inseticidas e inibidor do desenvolvimento de larvas (MURDOCK et al., 1990).

Outras atividades biológicas incluem: liberação de histaminas de mastócitos de cavidade peritoneal de ratos (GOMES, 1994), proliferação de linfócitos e produção de interferon- γ (BARRAL-NETTO et al., 1992), reação inflamatória e estimulação de macrófagos peritoneais (RODRIGUEZ et al., 1992), assim como, indução de edema de pata e migração de células peritoneais em ratos (BENTO et al., 1993).

Apesar da classificação das lectinas estar baseada nas suas respectivas especificidades a açúcares, cada membro do grupo mostra

diferenças apreciáveis nas suas propriedades biológicas e físico-químicas (MAKAELA, 1957). Uma hipótese para as diferenças de atividades biológicas das lectinas de espécies do gênero *Dioclea*, por exemplo, é a baixíssima variabilidade na estrutura primária. A comparação entre as estruturas primárias de todas as lectinas de espécies da subtribo Diocleinae mostra alto grau de homologia. Por isso, têm especificidade pelo mesmo açúcar: D-manose e D-glucose. As diferenças na intensidade da atividade biológica das lectinas da subtribo Diocleinae são provavelmente causadas, pelo menos em parte, pela afinidade ao carboidrato fino específico (CAVADA et al., 1993) por diferenças na potencia de afinidade por um mesmo carboidrato. Uma das especulações seria de que a habilidade das lectinas da subtribo Diocleinae de produzirem diferentes atividades biológicas seria pela relativa afinidade de seus receptores às células (CAVADA et al., 2001), outra hipótese seria a presença de diferentes isoformas para cada lectina, como ainda de diferentes equilíbrios dímero-tetrâmeros dependentes do pH de cada solução (figuras: 1 e 2) (GRANGEIRO et al, 1997; CALVETE et al., 1999).

Dioclea é um gênero pantropical de uma leguminosa. Foi classificada na família das Leguminosae, subfamília Papilionoideae, tribo Phaseoleae. Essa tribo foi dividida em oito subtribos (AYMARD E CUELLO, 1991): Cajaninae, Phaseolinae, Clitoriae, Ophrestiinae, Kennediinae, Erythrinae, Diocleinae e Glycininae, e a subtribo Diocleinae, divide em 13 gêneros (*Canavalia*, *Cleobulia*, *Pachyrhizus*, *Collea*, *Camptosema*, *Dioclea*, *Cratylia*, *Galactia*, *Cymbosema*, *Herpiza*, *Calopogonium*, *Macropsicanthus*, and *Luzonia*) dos quais somente as duas últimas não estão presentes em áreas tropicais. O gênero *Dioclea* tem sido dividido em três subgêneros: *Dioclea*, *Pachylobium* and *Platylobium* (BENTO et al., 1993).

A *Dioclea violacea* (Dviol) é da família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, tribo Phaseoleae, subtribo Diocleinae, gênero *Dioclea*, subgênero *pachylobium*. As sementes de *Dioclea violacea* Martius, (por exemplo: Bentham) contêm uma lectina que pode ser isolada por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50. Essa lectina mostra especificidade por D-manose (D-glucose) e seus derivados e apresenta ainda identidade imunológica total e seqüência N-terminal idêntica à de outras lectinas já isoladas da mesma subtribo. A lectina isolada Dviol aglutina preferencialmente

eritrócitos de coelho e é relativamente resistente a tratamento térmico, retendo 50% de sua atividade, mesmo após 7,5 min a 60°C ou 5 min a 80°C, com uma energia de ativação do processo de desnaturação de 25,04 kcal/mol (APARÍCIO et al., 1997).

Vários estudos têm mostrado diferentes propriedades das lectinas da subtribo *Diocleinae* como a habilidade de estimular células in vivo de linfonodos (BENTO et al., 1993). Rodriguez et al. (1992) reportaram o aumento local de mononucleares e polimorfonucleares após administração intraperitoneal de ConA (*concanavalina A*, de sementes de *Canavalia ensiformis*), ConBr (*Canavalia brasiliensis*) e DGL (*Dioclea grandiflora*) em camundongos BALB/c. Também foi descrita capacidade da ConBr (*Canavalia brasiliensis*) e DGL (*Dioclea grandiflora*) e da Dviol (*Dioclea violacea*) de induzir apoptose de células T. *Canavalia brasiliensis* e *Dioclea grandiflora* (ANDRADE et al., 1999) induzem produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos quando ativados pela injeção intraperitoneal dessas lectinas.

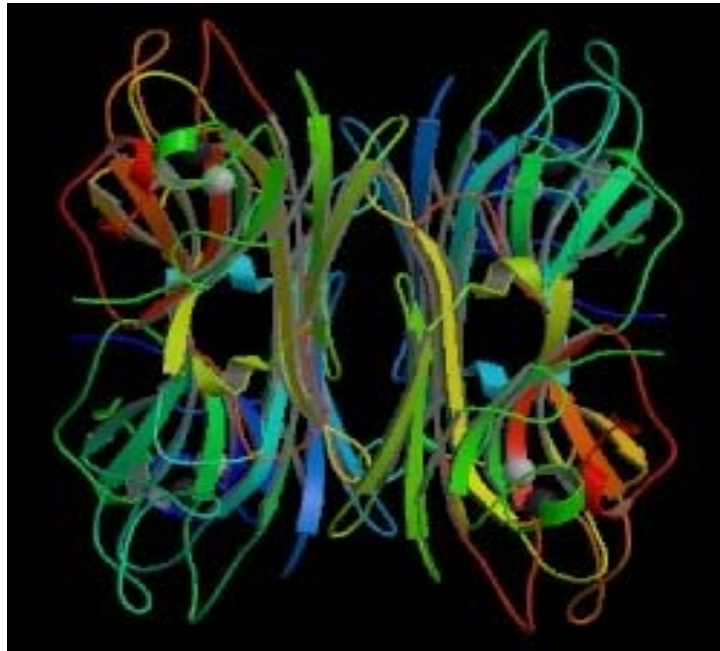


Figura 1: Tetrâmero da subtribo das *Diocleinae*. Imagem tridimensional (CALVETE et al, 1999).

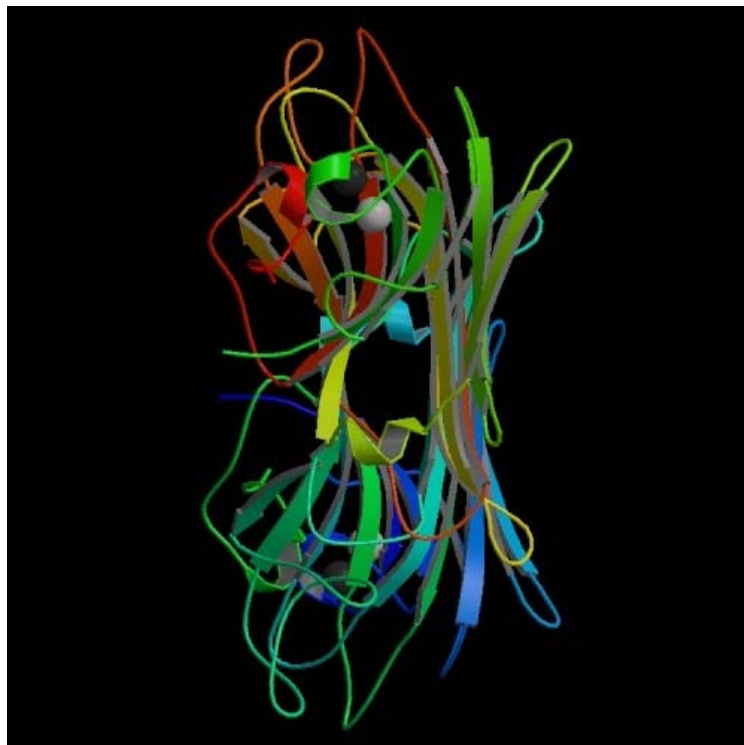


Figura 2: Tetrâmero da subtribo das *Diocleinae*. Imagem tridimensional (CALVETE et al, 1999).

1.4. Modelo de artrite induzida por zymosan (AZy):

A injeção do polissacarídeo derivado do fungo *Saccharomyces cerevisiae* (zymosan) em tecidos induz reação inflamatória, que já foi demonstrada após administração dessa substância na pele (RIDGER et al., 1997), na cavidade peritoneal (DOHERTY et al., 1985) ou em articulações (GADO E GIGLER, 1991).

Além de produzir reação inflamatória intensa, caracterizada por extensa sinovite, com migração de células inflamatórias de fase aguda e cronificação com proliferação linfomonocitária (GEGOUT et al., 1994, ROCHA et al., 1999), a artrite induzida por zymosan (AZy) também produz hipernocicepção (ROCHA et al., 1999).

A hipernocicepção, no modelo de artrite induzida por zymosan, foi caracterizada por Rocha e colaboradores, empregando o teste da incapacitação articular para ratos. Esse método foi desenvolvido para estudar hipernocicepção articular, definida nesse teste como incapacitação articular, que consiste na medida da habilidade do animal (rato) submetido ao estímulo de deambular normalmente. Nesse teste, a incapacitação articular (IA) é assumida como devida à alteração de nocicepção seqüente à injeção de um estímulo inflamatório nas articulações. Usando esse modelo, demonstramos que os animais desenvolvem progressiva incapacitação articular, que se inicia na segunda hora e se torna máxima entre a terceira e quarta horas após a injeção intra-articular do zymosan (Zy). Há ainda aumento da permeabilidade vascular levando ao edema local e acentuado influxo celular (máximo na sexta hora), com predomínio de polimorfonucleares. Postulou-se que a incapacitação articular medida pelo método acima descrito provavelmente está associada à estimulação de nociceptores localizados nos tecidos periarticulares e não na sinóvia per se (ROCHA et al., 1999).

A incapacitação articular (IA) é medida através do tempo de suspensão da pata (TSP) em s/min. Uma hora após a injeção de zymosan, os animais são colocados em uma roda giratória, com velocidade de 3 rpm (Figura 3). Esses animais são calçados com sapatilhas de metal na pata direita, especialmente desenhadas para o modelo. A pata direita é então conectada ao

computador, através da sapatilha, por um sistema input/ output. O TSP é medido através da capacidade de cada animal de tocar a roda ou não com a pata edemaciada. Quanto menor o tempo de contato com a roda, maior a incapacitação articular do animal. O TSP é medido a cada hora até a sexta hora, momento em que é feito o sacrifício dos animais. O teste de incapacitação articular, definida como a inabilidade do animal em andar normalmente, foi baseado no estudo realizado por Tonussi e Ferreira (1992).



Figura: 3- Sistema utilizado para medir a incapacitação articular (IA) dos animais submetidos à artrite induzida por zymosan (Azy).

1.5. Lectinas ligadoras de manose (MBL):

Lectina manose específica (MBL) é uma colectina plasmática (Lectina tipo-C com domínio semelhante ao colágeno) considerada como um importante componente da imunidade inata, participando, entre outras ações, da resistência natural inespecífica a infecções. A MBL circulante é geneticamente determinada em sua maior parte, mas a concentração plasmática também é influenciada por fatores não genéticos. A habilidade de ligação a carboidrato da MBL pode ser inibida por um açúcar simples como manose ou fucose, mas sua grande avidéz parece ser por manose de superfícies microbianas. Assim, a MBL pode se ligar a uma grande variedade de bactérias e micróbios, por neutralização ou opsonização dos mesmos, através de ativação do complemento (KILPATRICK, 2002).

Existem evidências que a deficiência da MBL pode estar associada à predisposição a infecções. No entanto, a natureza exata dessa relação permanece obscura (STANWORTH et al, 1998). Além da associação da deficiência ou polimorfismo da MBL com surgimento de infecções virais (HIV, Hepatite C) e infecções bacterianas (*Staphylococcus aureus*, *streptococcus β -haemolítico do grupo A*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, etc), existem evidências da participação da MBL na fisiopatologia de doenças auto-imunes como o lupus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide (KILPATRICK, 2002).

Ensaio clínico randomizados de terapia com MBL é um novo horizonte, devendo nos prover evidências do significado fisiológico da MBL na imunidade inata (KILPATRICK, 2002).

A superfamília das lectinas tipo-C (MBL) é um grande grupo de receptores transmembrana e proteínas solúveis que incluem as selectinas, receptores de asialoglicoproteínas e colectinas (EAST et al., 2002).

Infiltração de neutrófilos do sangue para o tecido afetado é a característica de uma reação inflamatória aguda. O recrutamento dessas células envolve um complexo e multimediado processo, o qual inclui interações seqüenciais entre neutrófilos, células endoteliais e componentes extracelulares da matriz. O passo inicial para a migração dos neutrófilos depende da sua ligação a selectinas expressas por células endoteliais venulares ativadas por mediadores inflamatórios. Três tipos de selectinas pertencentes à família das

lectinas eucarióticas tipo-C foram caracterizadas. As interações envolvendo selectinas são dependentes do reconhecimento de glicoconjugado específico da superfície celular, como por exemplo, a ligação específica polilactosaminas fucosiladas da superfície de leucócitos pela P-selectina endotelial humana. As selectinas são essenciais na migração dos leucócitos no processo inflamatório (ROZDZINSK et al., 1993).

Asseury et al. (1997) investigaram a capacidade de algumas lectinas de plantas, da subtribo *Diocleinae*, antagonizarem, *in vivo*, a migração de neutrófilos induzida por diferentes estímulos inflamatórios, sugerindo uma ação competitiva entre lectinas de plantas e as selectinas pela ligação glicosilada nos sítios presentes na superfície do endotélio, membrana de leucócitos ou componentes extracelulares da matriz, o que poderia expandir as possibilidades de desenvolvimento de análogos das selectinas com grande potencial antiinflamatório, possibilitando a aquisição de uma nova modalidade terapêutica. Mostrou-se então, que lectinas ligadoras de manose-glucose de plantas da família *Diocleinae* têm atividade antiinflamatória.

Deficiência de MBL está associada a aumento da freqüência de doenças auto-imunes e isso já pode estar relacionado com duas doenças clássicas, tais como: Lupus eritematoso sistêmico (LES) e Artrite Reumatóide (AR) (KILPATRICK, 2002). No LES, a deficiência de MBL parece estar associada a um aumento na susceptibilidade a doença, apesar do seu efeito ser fraco. Na AR, a associação é diferente, pois o que se observa não é um aumento na susceptibilidade a doença e sim uma associação com maior severidade da doença, principalmente artrite erosiva (KILPATRICK, 2002).

A lectina de sementes de *Dioclea violacea*, assim como as outras lectinas da subtribo *Diocleinae*, apresenta propriedades antiinflamatórias, como: redução de dano urotelial e eventos inflamatórios presentes na cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida (ASSEURY et al. 1999); inibição da migração de neutrófilos na cavidade peritoneal de ratos e diminuição do edema de pata, quer induzidos por fMLP (N-formil-L-leucil-L-fenilalanina) ou carragenina (ASSEURY et al., 1997).

Visto a importância de lectinas como a MBL em artrite e dos efeitos já descritos da lectina de sementes de *Dioclea violacea* e sua ação antiinflamatória, propusemo-nos a observar os possíveis efeitos dessa lectina

de planta no modelo de artrite induzida por zymosan. Os experimentos visaram observar a o efeito de uma lectina vegetal, a *Dioclea violacea*, no modelo já conhecido de artrite induzida por zymosan.

2. OBJETIVOS:

Avaliar os efeitos da *Dioclea violacea* no modelo experimental de artrite induzida por zymosan

2.1. Objetivos Secundários:

Avaliar os efeitos da Dviol na incapacitação articular

Avaliar os efeitos da lectina no influxo celular

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Lectina *Dioclea violacea* (Dviol)

A lectina de sementes de *Dioclea violacea* foi purificada de sementes coletadas no Horto Florestal de Porto Alegre-RS, descascadas, selecionadas no Campus da Universidade Federal do Ceará (UFC). Resumidamente, foi utilizada para extração das proteínas da farinha uma solução (1:10 m/v) de NaCl (0,15M), sendo que a suspensão foi mantida sob agitação constante, à temperatura ambiente, por 3 horas e o extrato protéico obtido, foi centrifugado (10.000 x g) durante 20 minutos, a 4° C. A purificação, a partir do extrato protéico, foi realizada por fracionamento com sulfato de amônio, seguida de cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 (MOREIRA et al, 1996). A pureza de cada etapa de purificação foi realizada no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (BIOMOL - UFC), por obtenção do perfil eletroforético, através de eletroforese em gel de poliacrilamida, em presença de SDS e 2-mercaptoetanol (não indicando outras bandas de outras proteínas) (LAEMMLI, 1970) (Figura 4).

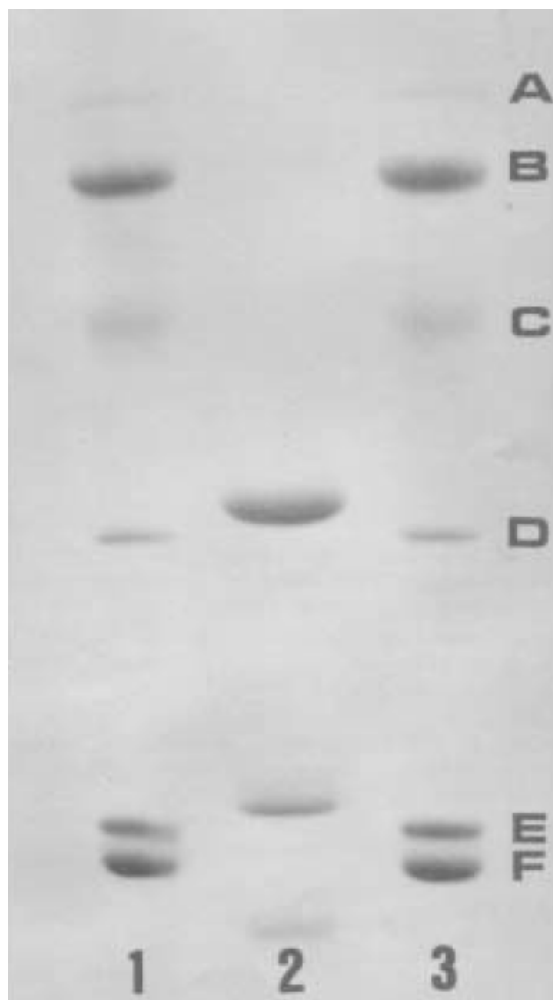


Figura 4. Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de 2-mercaptoetanol e de SDS da lectina purificada de sementes *Dioclea violacea* Linhas 1 e 3: marcadores de massa moleculares aparentes (A - fosforilase (94,4 kDa); B - albumina sérica bovina (66 kDa); C - ovalbumina (45 kDa); D - anidrase carbônica (29 kDa); E - mioglobina (17,5 kDa) e F - lisozima (14,3 kDa), Linha 2: lectina de sementes de *Dioclea violacea* (de cima para baixo, bandas correspondentes as cadeias alfa, beta e gama da lectina) (MOREIRA et al, 1996).

3.2. Animais

Os animais utilizados durante a execução do trabalho foram ratos Wistar machos, pesando entre 180 e 220g. Os animais foram fornecidos pelo biotério central do Campus do Pici - Universidade Federal do Ceará (UFC), sendo mantidos no biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da UFC, em condições controladas de temperatura (21° C), sob um ciclo de claro/escuro de 12/12h, com livre acesso à água e alimentação. Todos os procedimentos foram realizados seguindo as diretrizes preconizadas pelo Manual sobre Cuidados e Usos de Animais de Laboratório (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, 2003), com inúmeros esforços sendo feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados. O projeto científico desse trabalho foi previamente aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Ceará, recebendo o nº 05/05.

3.3. Soluções, drogas e reagentes

3.3.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados apresentavam grau de pureza e propriedades analíticas adequadas e as principais drogas utilizadas foram: **Zymozan** e **Manose** (Sigma St, Louis, MO., USA); Lectina *Dioclea violacea* (isoladas no **BIOMOL- Lab** – Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC) e **Heparina** (CRISTÁLIA - Brasil); **Hidrato de Cloral** (REAGEN).

3.3.2. Co-incubação da Manose com a DViol

A manose a 0,1 M foi diluída em solução salina e posteriormente co-incubada com a Dviol a 6mg/kg. Colocada em banho-maria a 37° C por 30 min, para fortalecer a ligação da lectina ao açúcar.

3.4. Protocolo Experimental

3.4.1. Indução da artrite por zymosan (AZy)

Após anestesia dos animais com éter inalado, induziu-se a artrite através da injeção intra-articular (i.a.) de 1mg de zymosan (Zy), diluído em 50µl de solução salina estéril, no joelho direito dos ratos. O grupo NAIVE recebeu apenas injeção intra-articular de solução salina estéril no joelho direito. Após 6 horas, foram sacrificados sob anestesia, com hidrato de cloral (400mg/kg, i.p.), por exsangüinação.

3.4.2. Análise da incapacitação articular

A medida da incapacitação articular foi iniciada uma hora após a injeção de zymosan intra-articular. Os animais foram previamente calçados com sapatilhas de metal nas patas posteriores, com a pata direita conectada ao computador. O tempo de suspensão da pata (TSP - seg/min) foi registrado quando os animais foram colocados para deambular em uma roda giratória. O TSP foi quantificado, de hora em hora, até a sexta hora após AZy. (Figuras 5 e 6).

3.4.3. Coleta do lavado articular

Os animais foram sacrificados, sob anestesia (hidrato de cloral – 400mg/kg, i.p.), por exsangüinação. Em seguida, realizou-se a lavagem da cavidade articular do joelho direito com duas injeções de 0,2 mL de solução

salina estéril (contendo 0,5 UI/ml de heparina), seguidas por aspiração. A conservação de todo coletado foi em banho de gelo.

3.4.4. Análise da celularidade do lavado articular

Após a coleta do lavado articular, utilizou-se uma amostra diluída em líquido de Turk a 10%, para contagem de células em câmara de Neubauer. Em seguida, o lavado articular foi centrifugado (3.000 g/10 min/4° C) e o sobrenadante estocado a -20° C.



Figura 5: Encaixe da sapatilha na pata do animal

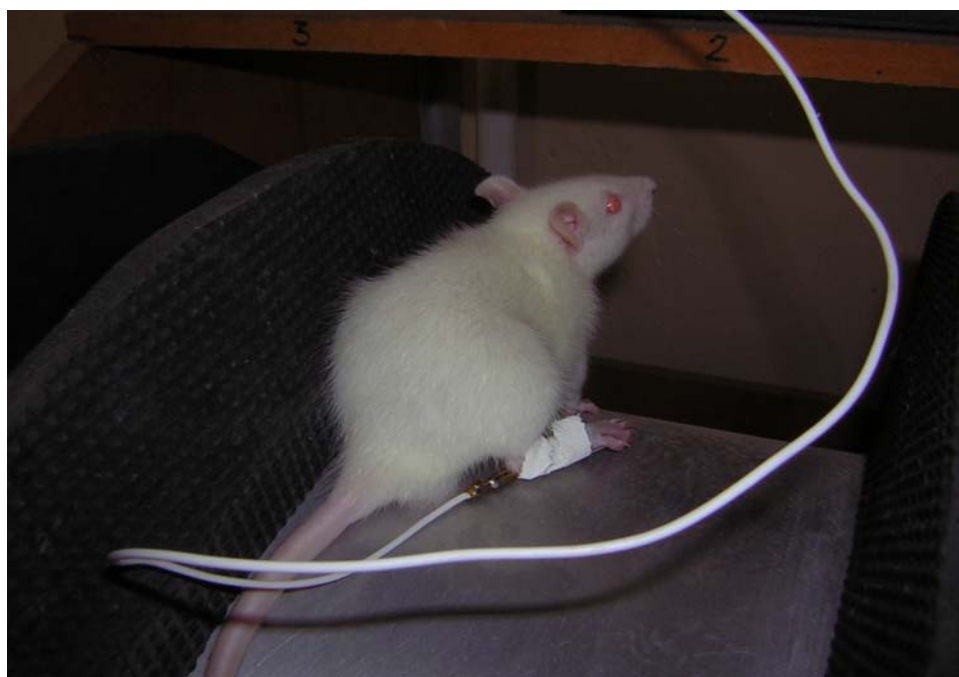


Figura 6: Animal no sistema de IA com sapatilha

3.5. Tratamento dos animais com lectina *Dioclea violacea*

3.5.1. Lectina *Dioclea violacea* endovenosa (e.v.)

Grupos de animais (n=6) foram previamente tratados, 30 min antes da injeção do zymosan, com a lectina de semente de *Dioclea violacea* (1, 3, 6 e 10 mg/kg; e.v.), injetada pela veia peniana. Utilizamos grupos complementares de 6 mg/kg de lectina ligada a manose (0,1M) (e.v.), na artrite por Zy, e 6 mg/kg da lectina (e.v.), em animais que receberam apenas salina i.a. A lectina foi diluída em solução salina estéril, em temperatura ambiente, por leve agitação para evitar a desnaturação protéica.

3.5.2. Lectina *Dioclea violacea* intra-articular (i.a.)

Grupos de animais (n=6) receberam apenas a injeção intra-articular de 100 µl de *Dviol.* (0,3; 3 e 30 µg), diluída em solução salina estéril. Outros grupos (n=6) receberam *Dviol.* i.a. (1,10 e 30 µg), 30 minutos antes da injeção intra-articular de zymosan.

3.6. Análise Estatística

Para comparações múltiplas entre médias, foi utilizada a análise de variância univariada (ANOVA). Na presença de significância, aplicou-se o teste de Tukey, adotando-se o nível de significância de 5% (alfa=0,05). Os resultados foram expressos como média ± e.p.m.

4. RESULTADOS:

4.1. Efeito do zymosan sobre a incapacitação articular em ratos submetidos à artrite induzida por zymosan (AZy)

A figura 7 mostra a incapacitação articular promovida pela administração intra-articular de zymosan (1mg) (grupo não tratado - NT), no decorrer de 6 horas. Observou-se, entre a 3^a e 4^a horas, um aumento significativo (TSP= $36,1 \pm 3,3$ e $19,3 \pm 0,8$ para 3^a e 4^a horas, respectivamente) ($p < 0,001$) dessa incapacitação no grupo NT, quando comparado aos animais que receberam apenas solução salina intra-articular (NAIVE).

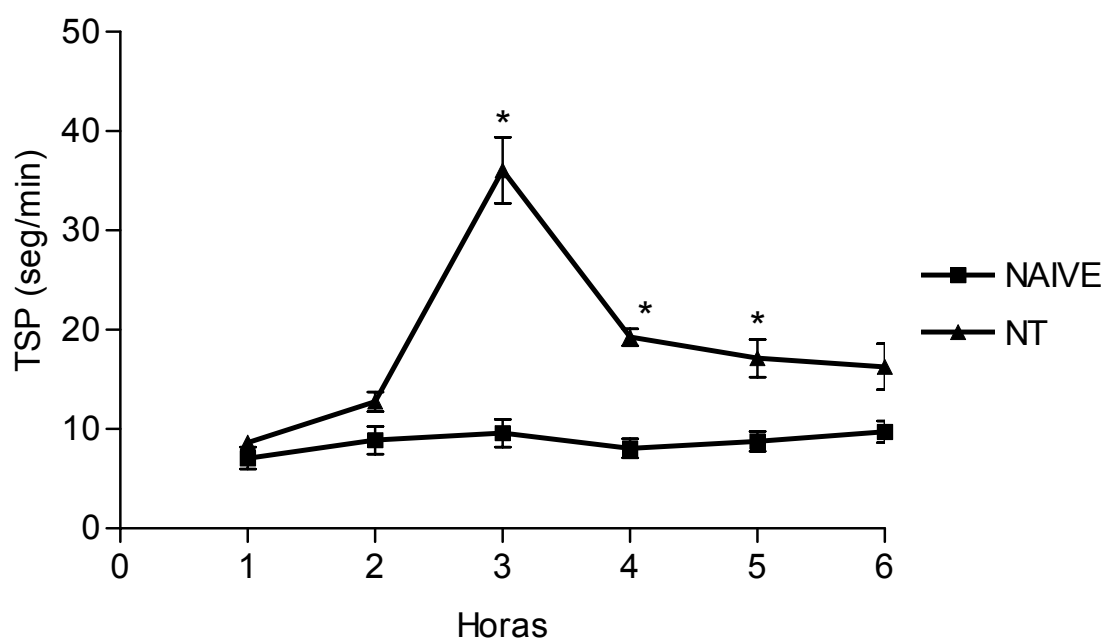


Figura 7 - Efeito do zymosan sobre a incapacitação articular na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos. Ratos Wistar receberam injeção intra-articular (i.a.) de zymosan (1mg) (grupo não tratado - NT) no joelho direito, sendo sacrificados, sob anestesia, após 6 horas da indução da AZy. A incapacitação articular foi registrada pelo tempo de suspensão da pata (TSP), a cada hora, por 6 horas. O grupo NAIVE representa os animais que receberam apenas salina intra-articular. Os dados representam a média \pm e.p.m. do TSP de 6 animais por grupo. * $p < 0,001$ quando comparado ao grupo NAIVE (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

4.2. Efeito do zymosan sobre o influxo celular em ratos submetidos à artrite induzida por zymosan (AZy)

A figura 8 ilustra o influxo celular promovido pela administração intra-articular de zymosan (1mg), em diferentes intervalos de tempo. Após 3 e 6 horas da indução da artrite por zymosan (AZy), houve um aumento significativo do influxo celular à cavidade articular ($37.950 \pm 1.561,2$ e $48.200 \pm 10.013,3$ células/mm³, para 3^a e 6^a horas, respectivamente), quando comparado ao grupo que recebeu apenas salina intra-articular (grupo NAIVE) ($856,3 \pm 389,5$) ($p < 0,001$).

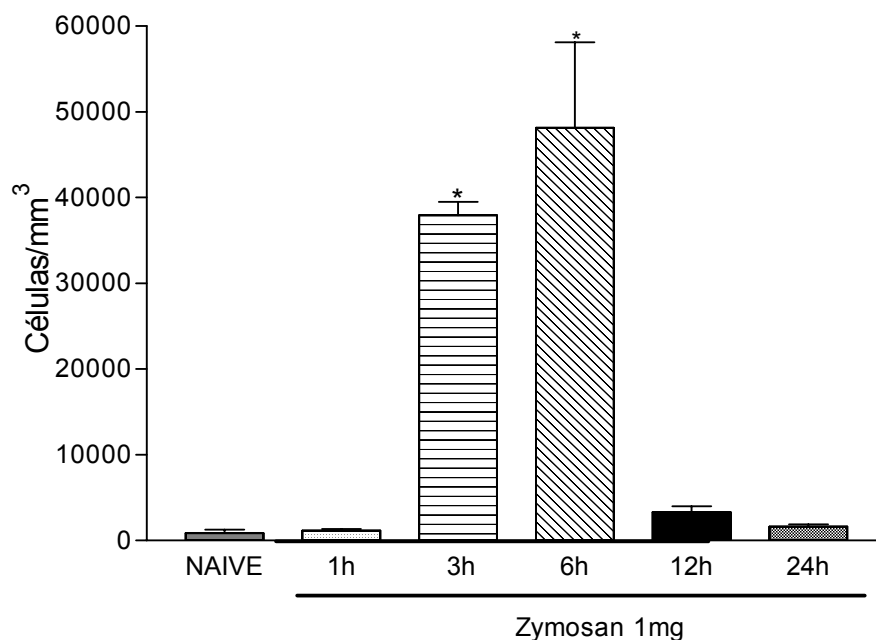


Figura 8 - Efeito do zymosan sobre o influxo celular na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos. Ratos Wistar receberam injeção intra-articular (i.a.) de zymosan (1mg) no joelho direito, sendo sacrificados, sob anestesia, após diferentes tempos de indução da AZy. O influxo celular foi registrado através da contagem de células no lavado articular nos seguintes tempos: 1, 3, 6, 12 e 24 horas. O Grupo NAIVE recebeu apenas salina intra-articular. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. do número de células/mm³ de 6 animais por grupo. * $p < 0,001$ em relação ao grupo NAIVE (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

4.3. Efeito da administração endovenosa (e.v.) da *Dioclea violacea* (Dviol) sobre a incapacitação articular na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos

A administração endovenosa (e.v.) de 6mg de *Dioclea violacea* (Dviol) e de salina intra-articular promoveu um tempo de suspensão da pata (TSP) semelhante ao do grupo NAIVE (animais que receberam apenas salina intra-articular e e.v.). A administração de Dviol (6mg mg/kg; e.v.), 30 minutos antes da AZy, reduziu significativamente ($p < 0,01$) o tempo de suspensão da pata (TSP) entre a 3ª e 4ª horas (TSP= $14,08 \pm 1,4$), quando comparado aos animais artríticos que receberam apenas salina e.v (grupo não tratado- NT). De forma semelhante, Dviol 10 mg/kg (e.v.) também reduziu o TSP na 3ª hora pós-zymosan (TSP= $20,6 \pm 1,72$) ($p < 0,001$). Nesse último grupo, os animais apresentaram lassidão, diarreia fétida, urina escura e convulsão, além de não resistirem após a 3ª hora de AZy. Contrariamente ao observado nas doses de 6 e 10mg, a administração de 1 e 3 mg de Dviol aumentou a incapacitação articular nos animais nas 4ª, 5ª e 6ª horas, quando comparados ao grupo NT ($p < 0,05$)(figura 9).

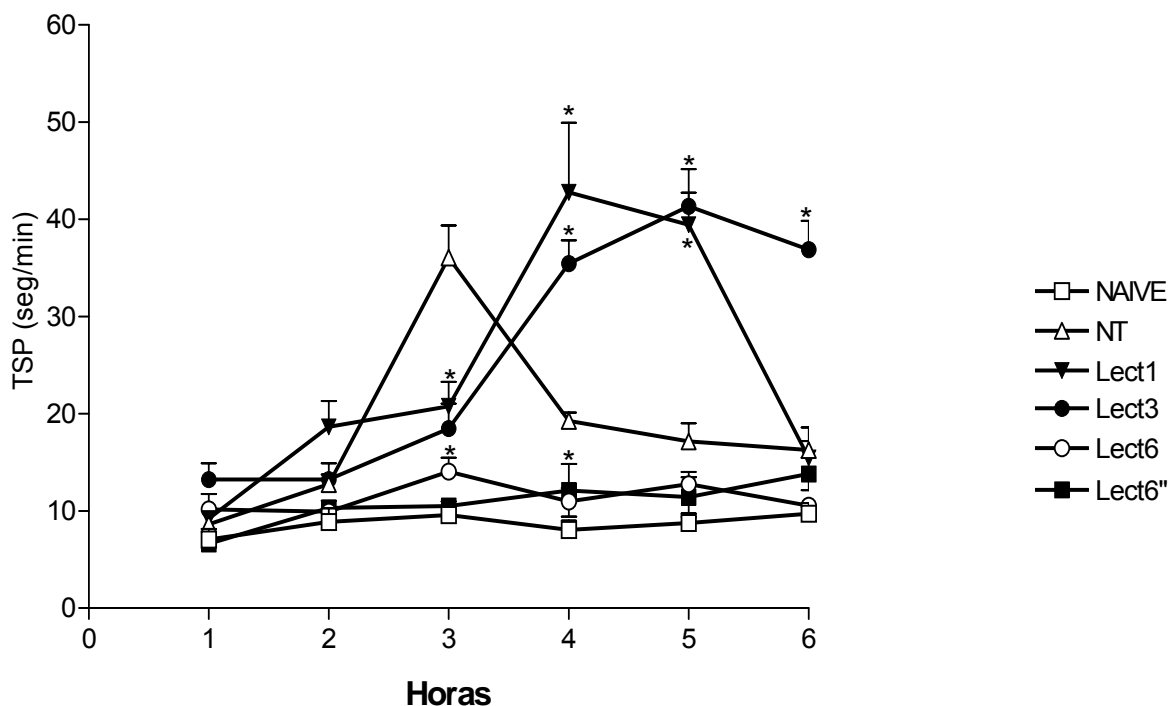


Figura 9 - Efeito da administração endovenosa (e.v.) da *Dioclea violacea* sobre a incapacitação articular na artrite induzida por zymosan (Azy) em ratos. Ratos Wistar receberam injeção intra-articular (i.a.) de zymosan (1mg) no joelho direito, sendo sacrificados, sob anestesia, após 6 horas da AZy. *Dioclea violacea* (1, 3 e 6mg/kg; e.v.) foi administrada 30 min antes do zymosan e um grupo de animais recebeu apenas 6mg/kg da lectina e.v. (Lec6''). NAIVE representa animais que receberam apenas salina intra-articular. O grupo NT representa animais que receberam apenas zymosan intra-articular e o veículo da lectina e.v. A incapacitação articular foi registrada a cada hora, por 6 horas, pelo tempo de suspensão da pata (TSP). Os dados representam a média \pm e.p.m. do TSP de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo NT (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

4.4. Efeito dose-dependente da administração endovenosa (e.v.) da *Dioclea violacea* (*Dviol*) sobre o influxo celular na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos

A administração endovenosa (e.v.) da *Dioclea violacea* (*Dviol*) (1, 3, 6 e 10 mg/kg) em ratos submetidos à AZy promoveu uma diminuição significativa e dose-dependente do influxo celular articular ($18.266,7 \pm 1.890,1$; $14.633,3 \pm 3.207,2$; $2.790 \pm 503,3$ e $120 \pm 37,4$ células/mm³ para lectina 1, 3, 6 e 10, respectivamente), quando comparado ao grupo que recebeu apenas salina e.v. e zymosan i.a. (NT) ($37.583,3 \pm 6.007,2$ células/mm³) ($p < 0,001$) (figura 10).

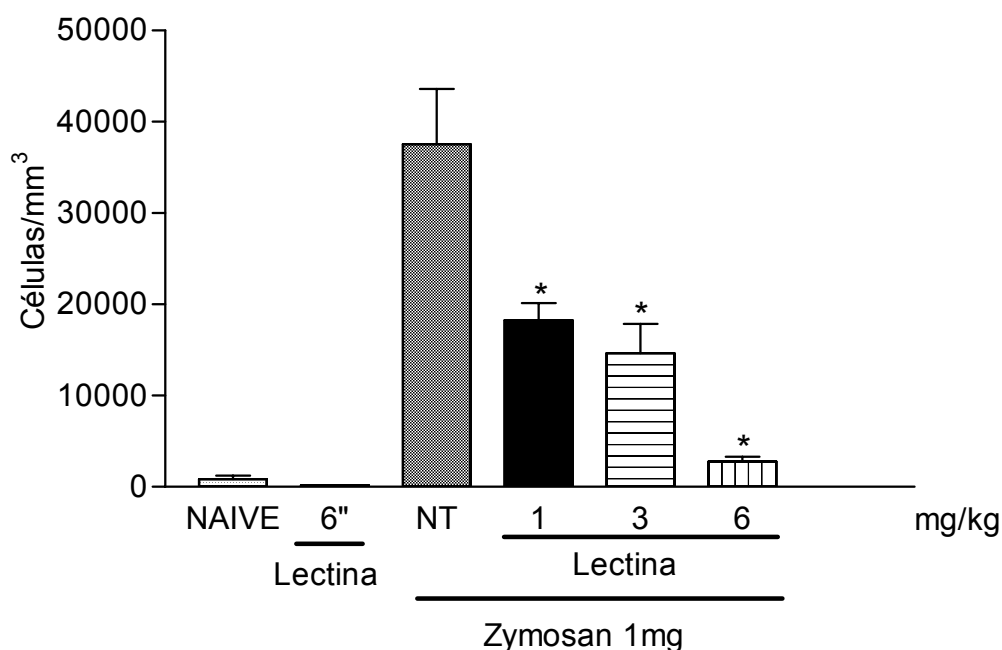


Figura 10 - Efeito dose-dependente da administração endovenosa (e.v.) da *Dioclea violacea* (*Dviol*) sobre o influxo celular na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos. Ratos Wistar receberam injeção intra-articular (i.a.) de zymosan (1mg) no joelho direito, sendo sacrificados, sob anestesia, após 6 horas da indução da AZy. *Dioclea violacea* (1, 3, 6 mg/kg/e.v.) foi administrada 30 min antes do zymosan. Um grupo a parte recebeu apenas 6 mg/kg da lectina. O grupo NAIVE representa os animais que receberam apenas salina intra-articular e e.v. O grupo não tratado (NT) representa os animais artríticos que receberam apenas o veículo da lectina e.v. O influxo celular foi registrado através da contagem das células no lavado articular. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. do número de células/mm³ de 6 animais por grupo. * $p < 0,001$ em relação ao grupo NT (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

4.5. Efeito da administração intra-articular (i.a.) da *Dioclea violacea* (*Dviol*) sobre a incapacitação articular em ratos

A figura 11 mostra que a administração intra-articular (i.a.) de 30 µg de *Dioclea violacea* promoveu um aumento significativo (TSP= 15,5 ± 0,9) da incapacitação articular, registrada entre a 3ª e 4ª horas, quando comparado ao grupo que recebeu apenas salina i.a. (NAIVE) (TSP= 9,9 ± 1,2) ($p < 0,05$).

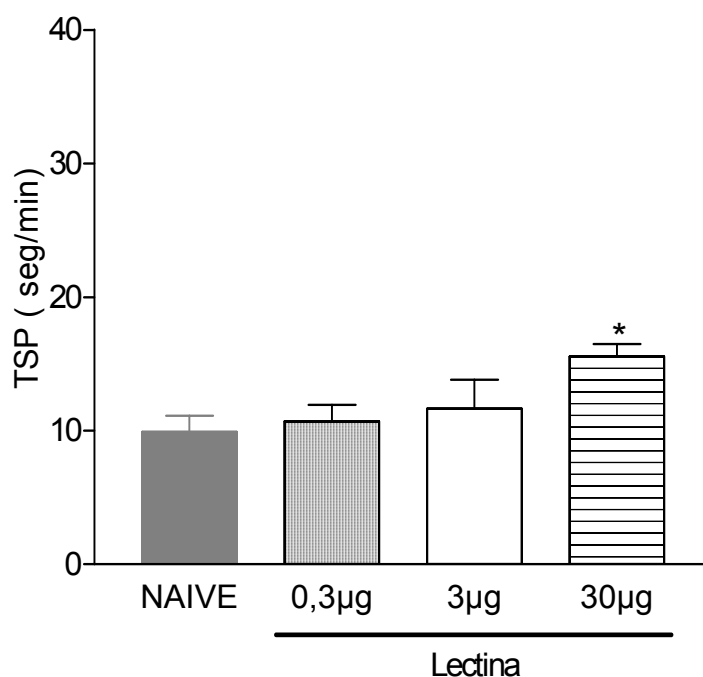


Figura 11 - Efeito da administração intra-articular (i.a.) da *Dioclea violacea* (*Dviol*) na incapacitação articular em ratos. Ratos Wistar receberam injeção intra-articular (i.a.) de solução salina estéril (50 µl) no joelho direito, sendo sacrificados, sob anestesia, 6 horas após. *Dioclea violacea* (0,3, 3 ou 30 µg/i.a.) foi administrada 30 min antes da salina i.a. O grupo NAIVE representa os animais que receberam apenas salina i.a. A incapacitação articular foi registrada pelo tempo de suspensão da pata (TSP), a cada hora, por 6 horas. Os resultados foram expressos como média ± e.p.m. do TSP (entre a 3ª e 4ª horas) de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo NAIVE (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

4.6. Efeito da administração intra-articular (i.a.) da *Dioclea violacea* (Dviol) sobre o influxo celular em ratos

A administração intra-articular (i.a.) de *Dioclea violacea* (Dviol) (0,3; 3 e 30 μg) aumentou significativamente o influxo celular (3.600 \pm 676; 4.958,3 \pm 1037,2 e 8.350 \pm 1.511,5 células/ mm^3 para lectina 0,3; 3 e 30, respectivamente), quando comparados aos animais que receberam apenas salina i.a. (NAIVE) (858,3 \pm 389,5 células/ mm^3) ($p < 0,05$) (figura 12).

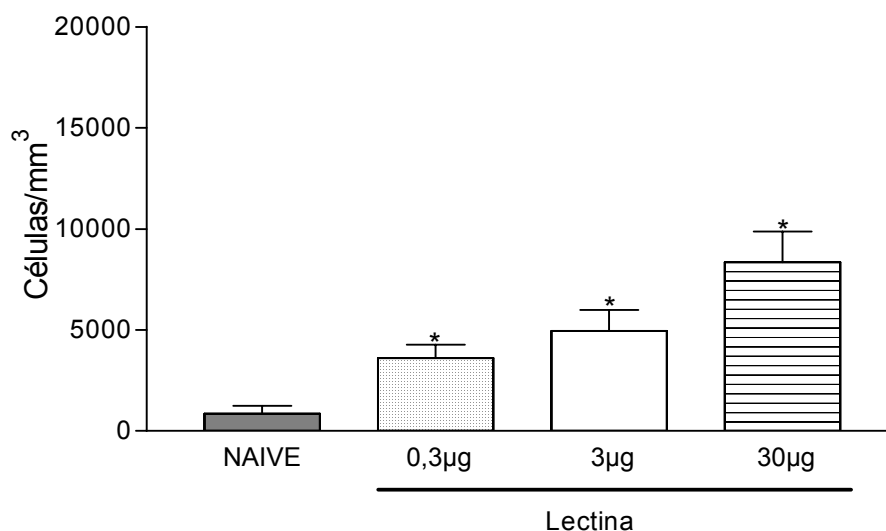


Figura 12 - Efeito da administração intra-articular (i.a.) da *Dioclea violacea* (Dviol) sobre o influxo celular em ratos. Ratos Wistar receberam injeção intra-articular (i.a.) de solução salina estéril (50 μl) no joelho direito, sendo sacrificados, sob anestesia, após 6 horas. *Dioclea violacea* (0,3, 3 ou 30 $\mu\text{g}/i.a.$) foi administrada 30 min antes da injeção de salina i.a. O grupo NAIVE representa os animais que receberam apenas salina i.a. O influxo celular foi registrado através da contagem de células no lavado articular. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. do número de células/ mm^3 de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo NAIVE (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

4.7. Efeito da administração intra-articular (i.a.) da *Dioclea violacea* (Dviol) sobre a incapacitação articular na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos

A administração intra-articular (i.a.) de 10 μg de *Dioclea violacea* (Dviol) promoveu uma diminuição significativa (TSP = $20,15 \pm 2,2$) ($p < 0,01$) da incapacitação articular (registrada entre a 3^a e 4^a horas), quando comparado ao grupo que recebeu salina e zymosan i.a. (NT) (TSP = $35,9 \pm 2,7$). Contrariamente, a administração de 30 μg de Dviol aumentou essa incapacitação, embora de forma não significante, quando comparado ao grupo NT ($p > 0,05$) (figura 13).

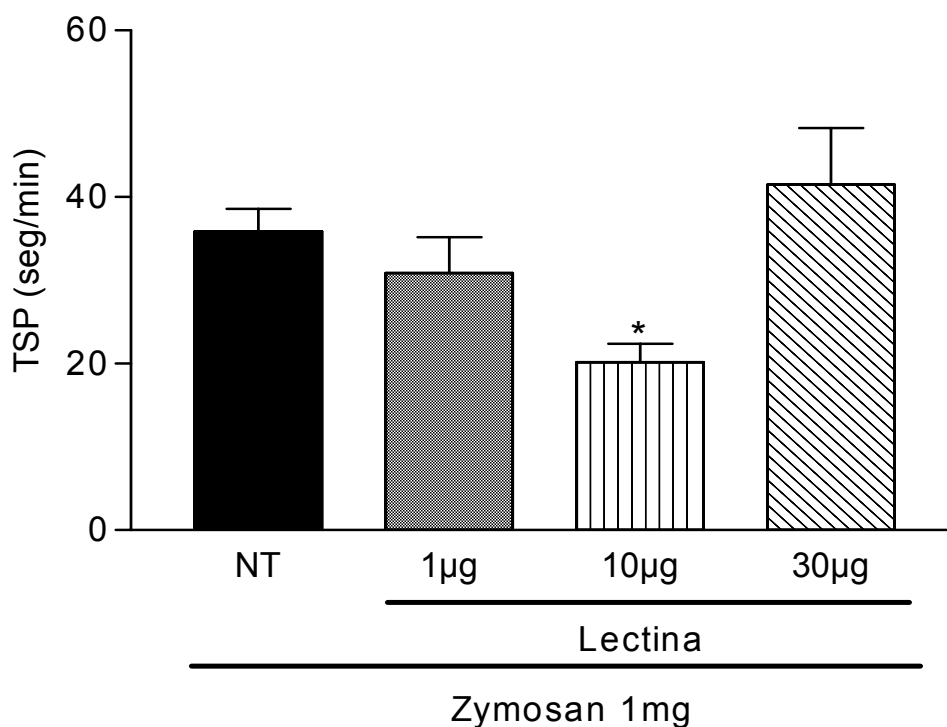


Figura 13 - Efeito da administração intra-articular (i.a.) da *Dioclea violacea* (Dviol) sobre a incapacitação articular na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos. Ratos Wistar receberam injeção intra-articular (i.a.) de zymosan (1mg) no joelho direito, sendo sacrificados, sob anestesia, após 6 horas da indução da AZy. *Dioclea violácea* (1, 10 e 30 $\mu\text{g}/\text{i.a.}$) foi administrada 30 min antes do zymosan. O grupo NT representa os animais que receberam salina e zymosan i.a. A incapacitação articular foi registrada pelo tempo de suspensão da pata (TSP), a cada hora, por 6 horas. Os dados foram expressos como média \pm e.p.m. do TSP (entre 3^a e 4^a horas) de 6 animais por grupo. * $p < 0,01$ quando comparado ao grupo não tratado (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

4.8. Efeito da administração intra-articular (i.a.) da *Dioclea violacea* (Dviol) sobre influxo celular na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos

De forma semelhante ao observado com a administração endovenosa, a injeção intra-articular (i.a.) de *Dviol* (1, 10 e 30 μ g) reduziu significativamente o influxo celular (18.266,7 \pm 1.890,1; 11.366,7 \pm 2.883,7 e 19.866,7 \pm 1.783,4 células/mm³ para lectina 1, 10 e 30, respectivamente), quando comparado ao grupo NT ($p < 0,05$) (figura 14).

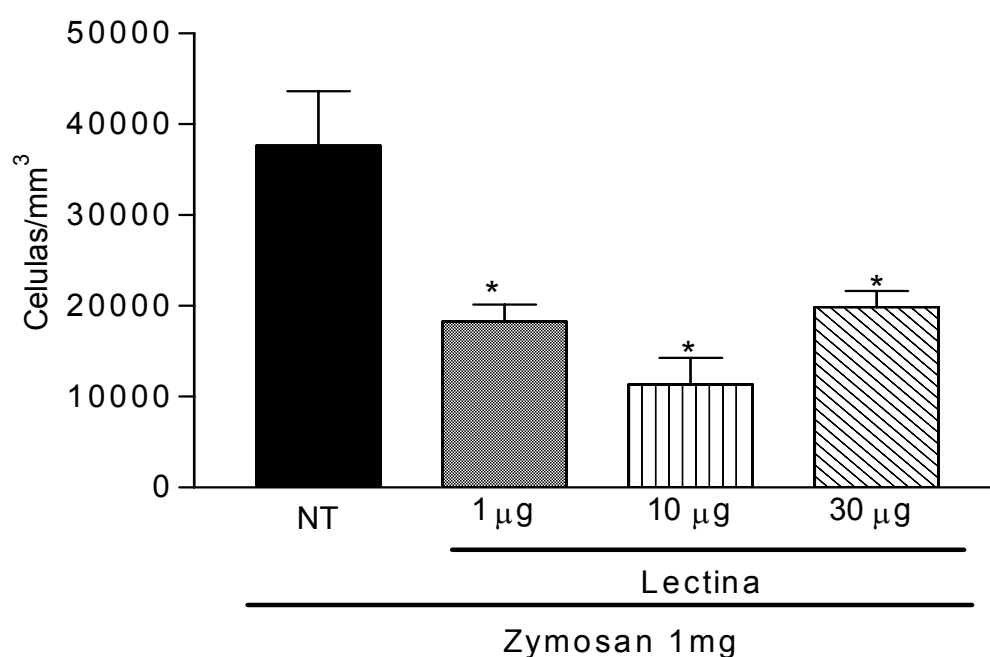


Figura 14 - Efeito da administração intra-articular (i.a.) da *Dioclea violacea* (Dviol) sobre o influxo celular na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos. Ratos Wistar receberam injeção intra-articular (i.a.) de zymosan (1mg) no joelho direito, sendo sacrificados, sob anestesia, após 6 horas. *Dioclea violacea* (1, 10 ou 30 μ g/i.a.) foi administrada 30 min antes do zymosan. O grupo NT representa os animais que receberam salina e zymosan i.a. O influxo celular foi registrado através da contagem de células do lavado articular. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. do número de células/mm³ de 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo NT (ANOVA seguida de teste de Tukey)

4.9. Reversão do efeito da *Dioclea violacea* (Dviol) endovenosa sobre a incapacitação articular, pela administração de manose, na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos

A co-administração endovenosa de *Dioclea violacea* (6 mg/kg) e manose (0,1M) promoveu um aumento significativo ($p < 0,001$) da incapacitação articular (TSP = $38,4 \pm 4,4$), quando comparado aos animais artríticos pré-tratados com 6 mg/kg de Dviol e.v. (TSP = $14,08 \pm 1,4$). Não houve diferença estatística entre os grupos NT (TSP = $36,1 \pm 2,7$) e manose ($38,4 \pm 4,4$) (figura 15).

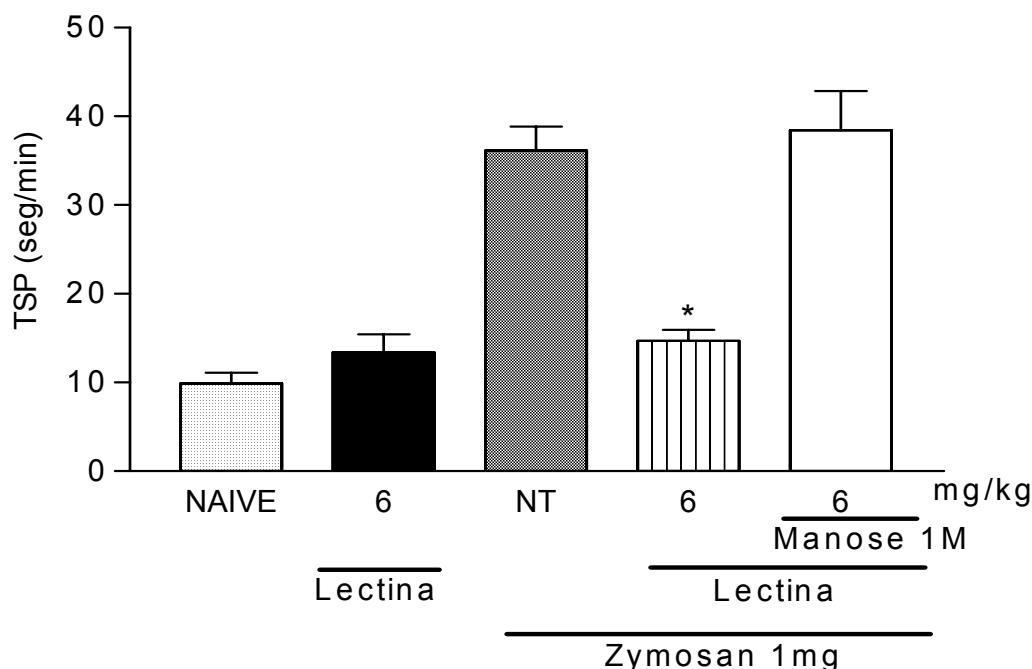


Figura 15 – Reversão do efeito da *Dioclea violacea* (Dviol) endovenosa sobre a incapacitação articular, pela administração de manose, na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos. Ratos Wistar receberam injeção intra-articular (i.a.) de zymosan (1mg) no joelho direito, sendo sacrificados, sob anestesia, após 6 horas. *Dioclea violacea* (6 mg/kg) foi administrada 30 min antes do zymosan (Zy). Grupos de animais receberam Dviol (6 mg/kg) e.v. e salina i.a.. Outros grupos receberam Dviol (6mg/kg) e manose (0,1M) e.v. e Zy i.a. O grupo NT representa os animais que receberam salina e.v. e Zy ia. O grupo NAIVE representa os animais que receberam salina e.v. e i.a. A incapacitação articular foi registrada pelo tempo de suspensão da pata (TSP), a cada hora, por 6 horas. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. do TSP (entre a 3ª e 4ª horas) de 6 animais por grupo. * $p < 0,001$ quando comparado ao grupo NT e ao grupo da manose (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

5. Reversão do efeito da *Dioclea violacea* (Dviol) endovenosa sobre o influxo celular, pela administração de manose, na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos

De forma semelhante ao observado com a incapacitação articular, a co-administração endovenosa de *Dioclea violacea* (6 mg/kg) e manose (0,1M) promoveu um aumento significativo ($p < 0,05$) do influxo celular ($15200 \pm 1829,7$ células/mm³), quando comparado aos animais artríticos pré-tratados com 6mg/kg de *Dviol* e.v. ($2.790 \pm 503,3$ células/mm³). À semelhança do observado com a administração de *Dviol* (6mg/kg; e.v.), o grupo manose apresentou uma diminuição significativa do influxo celular ($15.200 \pm 1829,7$ células/mm³), quando comparado ao grupo NT ($p < 0,001$) (figura 16).

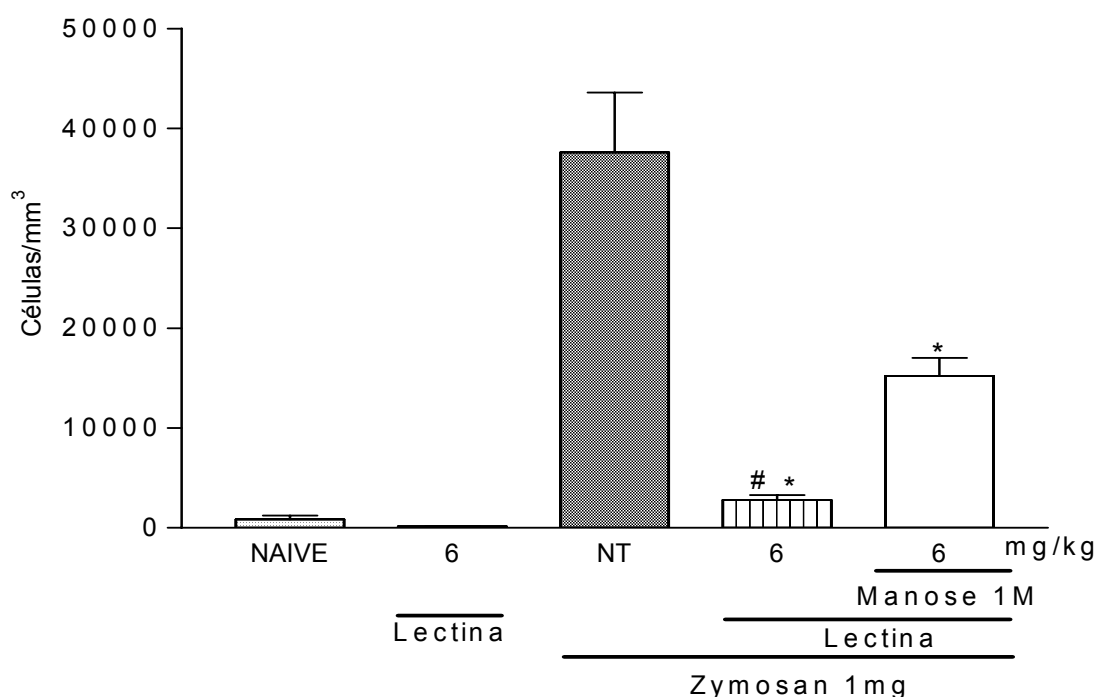


Figura 16 – Reversão do efeito da *Dioclea violacea* (Dviol) endovenosa sobre o influxo celular, pela administração de manose, na artrite induzida por zymosan (AZy) em ratos. Ratos Wistar receberam injeção intra-articular (i.a.) de zymosan (1mg) no joelho direito, sendo sacrificados, sob anestesia, após 6 horas. *Dioclea violacea* (6mg/kg) foi administrada 30 min antes do zymosan (Zy). Um Grupo de animais recebeu *Dviol* (6 mg/kg) e.v. e salina i.a.. Outro grupo recebeu *Dviol* (6mg/kg) e manose (0,1M) e.v. e Zy i.a. O grupo NT representa os animais que receberam salina e.v. e Zy i.a. O grupo NAIVE representa os animais que receberam salina e.v. e i.a. O influxo celular foi registrado através da contagem de células do lavado articular. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m. do número de células/mm³ de 6 animais por grupo. * $p < 0,001$ quando comparado ao grupo NT. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo da manose (ANOVA univariada seguida de teste de Tukey).

6. DISCUSSÃO

Lectinas, definidas atualmente como proteínas de origem não imune que apresentam pelo menos um sítio reversível de ligação a carboidrato (PEUMANS e VAN DAMME, 1995), são glico(proteínas) que, apesar de serem encontradas em todas as classes de seres vivos, ainda não têm suas funções endógenas completamente estabelecidas. São hoje consideradas, em certos casos, como insumos biotecnológicos.

As lectinas vegetais têm sido amplamente estudadas, juntamente com as animais, e tem sido largamente demonstrado o seu potencial *in vitro* e *in vivo* como coadjuvantes na terapia e diagnóstico de tumores (NEGRE et al, 1992) e reações inflamatórias. O uso das lectinas na microbiologia e parasitologia é extenso e baseia-se na identificação de estruturas de agentes infecciosos e, ocasionalmente, em um efeito protetor contra infecções, assim como em doenças inflamatórias (BARRAL-NETTO et al., 1996). Certos grupos de lectinas, apesar da alta similaridade estrutural que ocorre entre elas, apresentam marcantes diferenças de potência em várias atividades biológicas, como é o caso das lectinas do grupo da Concanavalina A (chamadas de “Con A-like” lectinas), taxonomicamente classificadas como lectinas de espécies da família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, tribo Phaseoleae e subtribo Diocleinae. Pode-se especular que a habilidade das lectinas da subtribo das *Diocleinae* em produzir diferentes respostas biológicas *in vivo* pode ser devido à relativa afinidade dos seus receptores às células (CAVADA et al., 2001), que seria um reflexo tanto de pequenas diferenças estruturais, como da presença de diferentes isoformas para cada lectina, como ainda de diferentes equilíbrios dímero-tetrâmeros dependentes do pH de cada solução (CALVETE et al., 1999).

No presente estudo, nós nos propusemos, de forma inédita, estudar a atividade antiinflamatória de uma lectina vegetal, obtida de sementes de *Dioclea violacea*, uma das lectinas Diocleinae, em um modelo de artrite induzida por zymosan em ratos. Os parâmetros avaliados foram a hiperalgesia (dor inflamatória) e a migração celular para a cavidade articular, na fase aguda da artrite induzida por zymosan.

Conforme foi descrito anteriormente (ROCHA et al., 1999), a injeção do zymosan no joelho dos animais provocou hiperalgesia aguda, que se iniciou em torno de 2 horas após a injeção do zymosan, sendo máxima entre 3 e 4 horas após a sua injeção, restabelecendo-se o nível basal na 6ª hora. Ainda reproduzindo resultados anteriores, obtivemos que o influxo celular na cavidade inflamada foi significativo a partir de 3 horas após a injeção do zymosan, sendo máximo às 6 horas, quando comparado aos valores basais. Esse influxo é composto majoritariamente de polimorfonucleares neutrófilos (>85%) (ROCHA et al., 1999).

A cinética de 1 a 6 horas do tempo de suspensão da pata – usado como parâmetro da hiperalgesia articular - na AZy, quando tratada com lectina endovenosa, evidenciou diminuição da incapacitação articular (hiperalgesia) nos animais tratados com 6 e 10mg/kg de lectina, em comparação aos animais que receberam apenas o zymosan intra-articular. Como controle, obtivemos que a administração endovenosa apenas de 6 mg/kg de Dviol não alterou a incapacitação articular, quando comparado aos valores basais. Esses resultados revelam um efeito antinociceptivo próprio da Dviol na hiperalgesia articular inflamatória.

Uma possibilidade para esse efeito antinociceptivo poderia ser alteração do comportamento pela administração da Dviol, provocando sedação. A observação clínica dos animais não revelou qualquer sinal de alteração de comportamento. Entretanto, os animais do grupo tratado com 10 mg/kg de Dviol apresentaram convulsões e sinais de depressão respiratória, levando-nos a interromper o experimento nesse grupo, 2 horas após a administração da lectina, em respeito às normas de ética em experimentação animal.

Nos grupos que receberam 1 ou 3mg/kg, obtivemos inibição da hiperalgesia até a terceira hora após a injeção do zymosan. Entretanto, a partir da quarta hora, estes animais apresentaram aumento da incapacitação articular mantida até a sexta hora, enquanto o grupo controle já apresentava-se em diminuição da IA desde a terceira hora. Esses dados revelam um aparente efeito paradoxal da Dviol, dependendo da dose administrada por via sistêmica, podendo exercer ação anti ou pró-nociceptivo.

Não nos é possível demonstrar a potencialização da hiperalgesia pelo método de registro da incapacitação articular, como utilizado no presente

estudo. De fato, o que obtivemos foi persistência da hiperalgesia nos animais que receberam as doses menores da lectina, principalmente no grupo tratado com 3 mg/kg, quando comparado aos animais que receberam apenas o zymosan intra-articular.

Não encontramos na literatura estudos mostrando que lectinas têm efeitos imunomoduladores diferentes de acordo com as doses utilizadas. Não nos foi possível concluir sobre os mecanismos responsáveis por essa ação da Dviol. Entretanto, podemos especular que alterações próprias decorrentes de ações da lectina ao nível do sistema nervoso central, modulando positivamente a transmissão de impulsos nociceptivos gerados a partir da administração do zymosan intra-articular, estejam associados à persistência da hipernocicepção observada com as menores doses utilizadas. Em consonância com essa possibilidade, estudo recente no nosso laboratório, demonstrou uma via de modulação periférico-central na artrite induzida por zymosan. Entretanto, a possibilidade que a *Dioclea violacea* possa agir nesse mecanismo ainda precisa ser estudada.

As doses empregadas no presente estudo tiveram como base publicações anteriores, usando outros modelos. Dados da literatura não evidenciaram toxicidade aguda nas doses de 5 a 10 mg/kg (ASSEURY et al., 1997. ALENCAR et al., 2005). Entretanto, como relatamos acima, o grupo que recebeu 10 mg de *Dioclea violacea* apresentou alterações sugerindo distúrbios do sistema nervoso central, levando à interrupção do experimento, com sacrifício antecipado dos animais. Essa toxicidade inviabilizou avaliar possível efeito sobre a hiperalgesia em doses maiores da *Dioclea violacea*. No presente estudo, utilizamos apenas ratos, e, ao contrário do descrito por Asseury et al (1997) e Alencar et al (2005), que usaram camundongos, com o grupo de 10 mg/kg foram observadas reações como: letargia, convulsões, sangramentos espontâneos e morte dos animais, sugerindo ser esta uma dose próxima da DL-50 da droga. Assim, é possível que a sensibilidade aos efeitos da *Dioclea violacea* varie com a dose, mas também com a espécie estudada.

Associado ao efeito sobre a incapacitação articular, a administração da *Dioclea violacea* promoveu significativa inibição do influxo celular às juntas inflamadas, de forma dose-dependente, sugerindo uma ação antiinflamatória própria dessa lectina. Considerando que neutrófilos são as células

predominantes no exsudato articular da fase aguda da artrite induzida por zymosan (ROCHA et al,1999), esse efeito inibitório da *Dioclea violacea* revela um possível efeito protetor da lectina para a lesão articular. De fato, a inibição da migração de neutrófilos é direta e positivamente associada com o benefício terapêutico em artropatias inflamatórias (LEFKOWITZ et al, 1999).

Crescentes evidências têm apontado para a participação de lectinas que se ligam a manose - MBL “manose-binding lectin”, encontrada em mamíferos - uma proteína de fase aguda sérica que se liga a um largo número de açúcares encontrados na superfície das células microbianas, como um importante componente do sistema imune inato. Associado a isso, estudos têm sugerido que a deficiência dessa proteína está associada a uma predisposição à infecção (SUMIYA et al, 1996). Estudos anteriores revelam que pacientes portadores de artrite reumatóide têm no seu líquido sinovial aumento nos níveis da proteína MBL. Essa lectina é capaz de se ligar fortemente a moléculas de glicoproteínas terminadas em manose ou N-acetilglicosamina, o que poderia mediar opsonização e ativação da via clássica do complemento. (TURNER et al,1996) (STANWORTH et al, 1998).

Em outra estratégia, investigamos o efeito da administração local da Dviol. Na dose de 30 µg, administrada por via local, ocorreu aumento significativo na incapacitação articular, sugerindo um efeito pró-nociceptivo próprio da lectina, provavelmente decorrente de ação pró-inflamatória. Essa possibilidade também é ilustrada pelo influxo celular promovido pela Dviol, quando administrada localmente.

No entanto, nos animais submetidos à artrite por zymosan, a administração concomitante intra-articular de 1, 10 ou 30 µg de *Dioclea violacea* promoveu redução significativa no influxo celular, de forma dose-dependente, quando comparado aos animais que receberam apenas o zymosan.

O recrutamento de neutrófilos a um tecido inflamado é uma cadeia complexa de interações de seqüências adesivas entre leucócitos e células endoteliais e/ou componentes da matriz extracelular. Essas interações adesivas são desencadeadas e/ou moduladas por moléculas de adesão. Entre elas, as selectinas são essenciais para uma precoce interação entre neutrófilos e células endoteliais (MCEVER, 1992). Tem sido proposto que inibidores contra

atividades adesivas das selectinas, com sua composição baseada em açúcares, possam prover um novo e mais efetivo medicamento antiinflamatório (VIRHAUS et al, 1995). Asseury et al, (1997) mostraram que lectinas de plantas glicose-manose específicas inibiram a migração de neutrófilos em cavidade peritoneal de ratos induzida por carragenina e N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP). Essa atividade inibitória no recrutamento de neutrófilos não foi devida à contaminação por endotoxinas e pôde ser revertida pelo carboidrato inibidor específico da lectina, o α -metil-manosídio, mas não por α -D-galactose (que não inibe a lectina). Naquele estudo, a Dviol causou reduções de até 70% dessa migração e, quando administrada 30 min antes do estímulo inflamatório na dose de 1mg/kg (e.v.) praticamente aboliu a migração de neutrófilos. Asseury et al. em 1999, mostrou efeito antiinflamatório de lectinas de sementes de espécies da subtribo *Diocleinae*. Lectinas de sementes de *Dioclea guianensis* e de *Dioclea violacea* reduziram lesão hemorrágica vesical induzida por ciclofosfamida, sugerindo um bloqueio competitivo com os sítios de ligação das selectinas, que estimulariam migração de neutrófilos.

Em um outro modelo experimental, de peritonite infecciosa, foi testada outra lectina de sementes de planta, a *Lonchocarpus sericeus*, que também foi utilizada na dose de 10 mg/kg e injetada por via intra-peritoneal, e apresentou um efeito tanto antiinflamatório como antimicrobiano (reduzindo o número de bactérias em cultura). A *Lonchocarpus* diminuiu a resposta inflamatória causada pela peritonite, inibindo a migração de neutrófilos e a atividade da adenosina deaminase (ADA). Esse efeito foi revertido quando se co-incubou a lectina com N-acetil-glucosamina. Assim, foi concluído que a ação da lectina se deveu ao envolvimento do domínio de ligação ao açúcar e não ao domínio protéico dessa proteína, efetuando provável bloqueio do sítio de ligação da selectina, inibindo assim, a migração de neutrófilos (ALENCAR et al, 2005).

No presente estudo, a lectina originada de sementes de Dviol apresentou ação antiinflamatória, quando administrada por via endovenosa. No intuito de demonstrar que esse efeito seria devido à ligação a domínios de açúcares aos quais a *Dviol* tem afinidade (açúcares do tipo manose-glucose), efetuamos a co-incubação da lectina com manose, previamente à administração. Essa estratégia provocou reversão significativa do efeito

antiinflamatório da lectina. Como controle, a administração apenas da manose não mostrou atividade biológica.

Considerando que as selectinas são essenciais para a migração dos neutrófilos no processo inflamatório, pode ser sugerido que a lectina de sementes de *Dioclea violacea* pode inibir o recrutamento dessas células até o tecido inflamado, provavelmente por um bloqueio competitivo com um sítio de carboidrato ligante da selectina em comum.

Em resumo, os resultados demonstram que a lectina isolada de sementes da Dviol apresenta efeito antiinflamatório no modelo de artrite induzida por zymosan, particularmente inibindo a migração de neutrófilos, na fase aguda do modelo. Uma ação sobre a hiperalgesia dessa lectina nesse modelo também foi revelada. Entretanto, essa última atividade parece ser influenciada por efeitos nociceptivos próprios da lectina, cujo esclarecimento carece de estudos complementares.

A pleora de lectinas existentes e sua variedade de atividades biológicas, estudadas vez em modelos de artrite no presente estudo, sugere que a investigação do papel de lectinas é relevante no esclarecimento de fenômenos inflamatórios osteoarticulares.

7. CONCLUSÕES:

A lectina isolada de semente de *Dioclea violacea* foi estudada no modelo de artrite induzida por zymosan (Azy) e observamos:

A lectina da *Dioclea violacea* apresenta efeito antiinflamatório neste modelo.

A *Dioclea violacea* inibe a migração de neutrófilos, possivelmente por bloqueio competitivo com receptores que se ligam à manose.

A Dviol age sobre a hiperalgesia, no modelo de artrite induzida por zymosan.

8. REFERÊNCIAS

1- ALENCAR N.M.N., CAVALCANTE C.F., VASCONCELOS M.P., LEITE K.B., ARAGÃO K.S., ASSREUY A.M.S., NOGUEIRA N.A.P., CAVADA B.S. and VALE M.R. Anti-inflammatory and antimicrobial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental rat model of infectious peritonitis. **J P P**, **57**: 919–922, 2005.

2- ANDRADE J.L., ARRUDA S., BARBOSA T., PAIM L., RAMOS M.V., CAVADA B.S. and BARRAL-NETTO M. Lectin-induced nitric oxide production. **Cell Immunol**, **194**: 98-102,1999.

3- APARICIO S.J., HERMOSO J., GRANGEIRO T.B., CALVETE J.J., CAVADA B.S. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. **FEBS Letters**, **405**: 114-118,1997.

4- ASSEURY A.M.S., SHIBUYA M.D., MARTINS G.J., de SOUZA M.L.P., CAVADA B.S., MOREIRA R.A., OLIVEIRA J.T.A., RIBEIRO R.A. and FLORES C.A. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators of inflammation**, **6**: 201-210, 1997.

5- ASSEURY A.M.S., MARTINS G.J., MOREIRA M.E.F., BRITO, G.A.C., CAVADA, B.S. RIBEIRO, R.A. and FLORES, C.A. Prevention of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. **The journal of Urology**, **161**: 1988-1993, 1999.

6- AYMARD, G.C. and CUELLO, N.A. Catalogo y adiciones a las especies neotropicales del genero *Canavalia* (Leguminosae- Papilionoideae- Diocleinae). Seminario-Taller de Trabajo sobre *Canavalia* (*Canavalia ensiformis* (L) DC), **Maracay, Venezuela, 25-28 june**, 1991. Pre-circulated Paper.

7- BARBOSA T., ARRUDA S., CAVADA B., GRANGEIRO T.B., Freitas L.A.R. and BARRAL-NETTO M. In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the diocleinae subtribe. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **96(5)**: 673-678, 2001.

8- BARRAL-NETTO, M., SANTOS, S.B., BARRAL, A., MOREIRA, L.I.M., SANTOS, C.F., MOREIRA, R.A., OLIVEIRA, J.T.A. and CAVADA. B.S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Dioclea tribe. **Immunol Invest**, **21**: 297-303, 1992.

- 9- BARRAL-NETTO M., VON SOHSTEN R.L., TEIXEIRA M., DOS SANTOS W.L., POMPEU M.L., MOREIRA R.A., OLIVEIRA J.T., CAVADA B.S., FALCOFF E. and BARRAL A. In vivo protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta Trop**, **60(4)**:237-50, 1996.
- 10- BENTO C.A., CAVADA B.S., OLIVEIRA J.T., MOREIRA R.A. and BARJA-FIDALGO C. Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. **Agents Actions**, **38**: 48-54, 1993.
- 11- CALVETE J.J, THOLE H.H, RAID A M., URBANKE C., ROMERO A., GRANGEIRO T.B., RAMOS M.V., ROCHA I.M.A. and GUIMARÃES F.N. and CAVADA B.S. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochimica et Biophysica Acta** **1430**: 367-375, 1999.
- 12- CAVADA B.S., MOREIRA R.A.; OLIVEIRA J.T.A and GRANGEIRO T. B., Primary structures and functions of plant lectins. **R Bras Fisiol Veg** **5(2)**: 193-201, 1993.
- 13- CAVADA B.S., BARBOSA T., ARRUDA S., GRANGEIRO T.B. and BARRAL-NETO M., Revisiting *proteus*: Do Minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein and Peptide Science**, **2**: 123-135, 2001.
- 14- CHANG Y.H., PEARSON C.M. and ABE C. Adjuvant polyarthritis IV: induction by a synthetic adjuvant: immunologic, histopathologic and other studies. **Arthritis Rheum**, **23**:62-71, 1980.
- 15- DANGUY A., CAMBY I. and KISS R., Galectins and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1572**:285– 293, 2002
- 16- DOHERTY N.S., POUBELLE P., BERGEAT P., BEAVER T.H., WESTRICH G.L and SCHRADER N.L. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. **Prostaglandins**, **30(5)**: 769-89, 1985.
- 17- DUMONDE D.C. and GLYNN L.E. The production of arthritis in rabbits by an immunological reaction to fibrin. **Br J Exp Pathol**, **43**: 373-382, 1962.

18- EAST L. and ISACKE C.M., The mannose receptor family. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1572**: 364-386, 2002.

19- GADO K. and GIGLER G. Zymosan inflammation: a new method suitable for evaluating new antiinflammatory drugs. **Agents Actions**, **32(1-2)**:119-21, 1991.

20- GEGOUT P., GILLET P., CHEVRIER D., GUINGAMP C., TERLAIN B. and NETTER P. Characterization of zymosan-induced arthritis in the rat: effects on joint inflammation and cartilage metabolism. **Life Sci**, **55(17)**: 321-6, 1994.

21- GOLDSTEIN I.J., HUGHES R.C., MONSIGNY M., OSAWA T., and SHARON N. What should be called a lectin? **Nature**, **285**: 66, 1980.

22- GOMES J.C., FERREIRA R.R., CAVADA B.S., MOREIRA R.A. and OLIVEIRA J.T.A. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with concanavalin A. **Agents Actions**, **41 (3-4)**: 132-135, 1994.

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

24- HARRIS Jr., E.D. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. **N Engl J Med**, **322(18)**: 1277-1289, 1990.

25- HEYMER B., SPANEL R. and HFERKAMP O. Experimental models of arthritis. **Curr Top Pathol**, **71**: 123-152, 1982.

26- KILPATRICK D.C., Mannan-binding lectin and its role in innate immunity. **Transfusion Medicine**, **12**: 335-351, 2002.

27- KILPATRICK, D.C. Mannan-binding lectin: Clinical significance and applications (Review). **Biochimica et Biophysica Acta**, **25378**: 1-13, 2002.

28- LAEMMLI U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, **227 (5259)**: 680-685, 1970.

29- LEFKOWITZ D.L., GELDERMAN M.P., FUHRMANN S.R., GRAHAM S., STARNES J.D. 3RD, LEFKOWITZ S.S., BOLLEN A., MOGUILVSKY N.

Neutrophilic myeloperoxidase-macrophage interactions perpetuate chronic inflammation associated with experimental arthritis. **Clin Immunol**, **91 (2)**: 145-155, 1999.

30- MAKAELE D. Studies in hemagglutinins of leguminosae seeds. **Annals of Medical and Experimental Biology Fenn**, **35**: s11, 1-156, 1957.

31- MCEVER R.P. Leukocyte-endothelial cell interactions. **Curr Opin Cell Biol**, **4(5)**: 840-9, 1992.

32- MOREIRA R.A., AINOZ I.L., OLIVEIRA J.T.A. and CAVADA B.S., Plant lectins: chemical and biological aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **86 (sii)**: 212-218, 1991.

33- MOREIRA R.A., CORDEIRO E.F., RAMOS M.V., GRANGEIRO T.B., MARTINS J.L., OLIVEIRA J.T.A. and CAVADA B.S., Isolation and Partial Characterization of a Lectin from seeds of *Dioclea violacea*. **Rev Bras Fisiol Veg**, **8(1)**: 23-29, 1996.

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

35- MYLLYKANGAS-LUOSUJA-RVI R., AHO K., KAUTIAINEN H., ISOMA-KI H. Shortening of life span and causes of excess mortality in a population-based series of subjects with rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol**, **13**:149-53, 1995.

36- NEGRE E., CHANCE M.L., HANBOULA S.Y., MONSIGNY M., ROCHE A.C., MAYER R.M. and HOMMEL M. Antileishmanial drug targeting through glycosylated polymers specifically internalized by macrophage membrane lectins. **Antimicrob Agents Chemother**, **36(10)**: 2228-2232, 1992.

37- PEUMANS W.J. and VAN DAMME E.J.M. Lectins as plant defense proteins. **P Physiol**. **109**: 347-352, 1995.

38- RIDGER V.C., PETTIPHER E.R., BRYANT C.E. and BRAIN S.D. Effect of the inducible nitric oxide synthase inhibitors aminoguanidine and L-N⁶-(1-iminoethyl) lysine on zymosan-induced plasma extravasation in rat skin. **J Immunol**, **159(1)**: 383-90, 1997.

39- ROCHA F.A., ANDRADE L.E., RUSSO M. and JANCAR S. PAF modulates eicosanoids and TNF release in immune-complex arthritis in rats. **J Lipid Mediat Cell Signal**, **16(1)**: 1-10, 1997.

40- ROCHA F.A., ARAGAO A.G. JR., OLIVEIRA R.C., POMPEU M.M., VALE M.R. and RIBEIRO R.A. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. **Inflamm Res**, **48(9)**: 485- 90,1999.

41- RODRIGUEZ D., CAVADA B.S., ABREU-DE-OLIVEIRA J.T., DE-AZEVEDO-MOREIRA R. and RUSSO M. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/ mannose-binding plant lectins. **Braz J Med Biol Res**, **25**: 823-826, 1992.

42- ROZDZINSK E., BURNETTE W.N., MAR V., MASURE H. and TUOMANEN E. Prokaryotic peptides that block leukocyte adherence to selectins. **J Exp Medicine**, **178**: 917-924, 1993.

43- STANWORTH S.J., DONN R.P., HASSALL A., DAWES P., OLLIER W. and SNOWDEN N. Absence of an association between mannose-binding lectin polymorphism and rheumatoid arthritis. **British journal of Rheumatology**, **37**: 186-188, 1998.

44- SUMIYA M. and SUMMERFIELD J.A. Mannose-binding protein, genetic variants and the risk of infection. **Q J Med**, **89**: 723-726, 1996.

45- TONUSSI C.R. and FERREIRA S.H. Rat knee-joint carrageenin incapacitation test: an objective screen for central and peripheral analgesics. **Pain**, **48(3)**:421-7, 1992.

46- TURNER M.W. Mannose-binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. **Immunol Today**, **17**: 532-540, 1996.

47- VIRKHAUS R., LUCCHECI B.R., SIMPSON P.J. and SHEBUSKI R.J. The role of adhesion molecules in cardiovascular pharmacology: meeting review. **J Pharmacol Exp Ther**, **273 (2)**: 569-75, 1995.

48- WAH, D.A., ROMERO A., SOL F., Gallego D., CAVADA B.S., RAMOS M. V., GRANGEIRO T.B., SAMPAIO A.H., CALVETE J.J. Crystal structure of native and Cd/Cd-substituted Dioclea guianensis seed lectin. A novel

manganese binding site and structural basis of dimer-tetramer association.
Journal of Molecular Biology, **310 (4)**: 885-894, 2001.

Ficha Catalográfica

P162a Paim, Luciana Brandão
Ação antiinflamatória da lectina de semente de *Dioclea violacea* na artrite induzida por zymosan / Luciana Brandão Paim. - Fortaleza, 2006.
61 B.: il
Orientador: Prof. Dr. Francisco Airton Castro da Rocha
Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará. Faculdade de medicina.
1. Artrite Experimental 2. Zymosan 3. Receptores Mitogênicos 4. Lectinas de plantas – uso terapêutico 5. Fabaceae I. Rocha, Francisco Airton Castro da (orient.) II Título.

CDD 615323322

