



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

SAMARA RODRIGUES BONFIM DAMASCENO

**EFEITO ANTINECRÓTICO DAS LECTINAS ConA E ConBr NA
LESÃO DE CÉLULAS ACINARES PANCREÁTICAS INDUZIDA POR
SAIS BILIARES, ÁLCOOL E ÁCIDO PALMITOLEICO:
ENVOLVIMENTO DO DOMÍNIO LECTÍNICO**

FORTALEZA - CE

2015

SAMARA RODRIGUES BONFIM DAMASCENO

**EFEITO ANTINECRÓTICO DAS LECTINAS ConA E ConBr NA
LESÃO DE CÉLULAS ACINARES PANCREÁTICAS INDUZIDA POR
SAIS BILIARES, ÁLCOOL E ÁCIDO PALMITOLEICO:
ENVOLVIMENTO DO DOMÍNIO LECTÍNICO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares

FORTALEZA - CE

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- D162e Damasceno, Samara Rodrigues Bonfim.
Efeito antinecrótico das lectinas ConA e ConBr na lesão de células acinares pancreáticas induzida por sais biliares, álcool e ácido palmitoleico: envolvimento do domínio lectínico/ Samara Rodrigues Bonfim Damasceno. – Fortaleza, 2015.
109 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2015.
Orientação: Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares.
1. Pancreatite Necrosante Aguda. 2. Morte celular. 3. Lectinas de Plantas. I. Título.
-
- CDD 616.37


SAMARA RODRIGUES BONFIM DAMASCENO

**EFEITO ANTINECRÓTICO DAS LECTINAS ConA E ConBr NA
LESÃO DE CÉLULAS ACINARES PANCREÁTICAS INDUZIDA POR
SAIS BILIARES, ÁLCOOL E ÁCIDO PALMITOLEICO:
ENVOLVIMENTO DO DOMÍNIO LECTÍNICO**


Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Medicina do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Aprovada em: 19 de janeiro de 2015.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares
Orientador
Universidade Federal do Ceará – UFC


Profa. Dra. Alana de Freitas Pires
Universidade Estadual do Ceará – UECE


Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá
Universidade Federal do Ceará- UFC

Esta vitória eu dedico aos meus pais Joaquim Raimundo do Bonfim Rita de Cássia e Helena Maria Monteiro Rodrigues e à minha avó Maria de Lourdes Monteiro Rodrigues, pelo amor incondicional que me manteve forte, pelas orações que me mantiveram protegida e por não terem medido esforços para proporcionar a melhor educação que podiam me oferecer. Obrigada por tanto amor e cuidado!

AGRADECIMENTOS

Sobretudo ao nosso glorioso Deus, por tanta bondade, por guiar sempre os meus caminhos e permitir a realização de cada pequeno ou grande sonho que eu venha a ter.

Ao meu orientador de mestrado, Prof. Dr. Pedro Marcos Gomes Soares, pela disponibilidade e solidariedade em ajudar sempre que necessário, pelos conselhos científicos, pelo grande incentivo profissional, pelas cobranças, pois precisamos delas para crescer, pelo convívio harmonioso e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Ricardo de Freitas Lima, pelas conversas descontraídas na hora do café e pela gentileza em tirar algumas dúvidas sempre que o procurei.

Ao Prof. Dr. Marcellus Henrique Loiola Pontes Souza pelo apoio e pela solicitude.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Albuquerque Ribeiro, por ter aberto as portas do LAFICA (Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer) para mim, pelo sorriso sempre aberto, pelo exemplo de profissionalismo e pelos momentos de descontração na sua casa de praia.

Aos professores Reinaldo Barreto Oriá, Alana de Freitas Pires e Diego Veras Wilke por terem aceitado o convite para participar desta banca.

Ao Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada, por ter cedido as lectinas utilizadas neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Jand-Venes Rolim Medeiros, por ter incentivado os meus primeiros passos na pesquisa durante a iniciação científica. Os passos seguintes foram continuidade do que aprendi como sua aluna.

Ao amigo Diego Holanda, por ter desenhado o modelo hipotético deste trabalho.

Agradeço imensamente ao meu namorado Renan Oliveira Silva, por se fazer presente na minha vida desde os primeiros passos na iniciação científica, pelos ensinamentos profissionais e pessoais no decorrer desses anos. Pela grande ajuda nessa fase final do mestrado, e pelas provas de amor diárias que sempre me dá... Seu apoio foi um dos meus grandes pilares de sustentação nos momentos mais difíceis.

Às minhas companheiras de morada, Herlice do Nascimento Veras e Ana Karolina Silva Santos, pela convivência harmoniosa, pela amizade e companheirismo.

À toda a família LAFICA, pelos momentos de imensa alegria convividos dia a dia no laboratório (Kaira, Deysen, Cecília, Bárbara, Priscila, Talita, Patrícia, Tiago, Marcos Aurélio, Ronaldo, Bruna, Fabinho, Anamaria, Kalina, Sarah, Mário, Rafael e a todos os demais amigos), a harmonia e amizade que temos no nosso laboratório nos motiva a seguir em frente, tornando as dificuldades mais fáceis de superar.

À Vanessa Azevedo Mendonça, pela amizade firme e companheirismo desde os primeiros meses de mestrado.

Ao Álvaro Xavier Franco, pelos ensinamentos iniciais das técnicas de isolamento e cultura de células e pela amizade.

À Marielle Pires Quaresma, pela amizade, companheirismo e parceria na realização dos meus experimentos.

Ao Pedro Almir Feitosa Moraes, pela solicitude e dedicação como aluno de iniciação científica, pela ajuda sempre presente.

A todos os alunos de iniciação científica do LAFICA pelos cuidados e manutenção dos nossos animais e pela dedicação e zelo de cada um.

À Vandinha França Pinheiro, por ser uma mãe para todos nós!! Pela sua disponibilidade em ajudar sempre!

À Paulinha, Ana Paula Macedo Santana, e à sua doce irmã Ana Creusa (Aninha) por terem me acolhido gentilmente em sua casa na época da seleção do mestrado. A ajuda e amizade das duas foram essenciais para a minha jornada.

Ao François Cosker pelas grandes contribuições que me deu em muitos aspectos da microscopia confocal.

A toda a equipe que coordena o Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará pela dedicação em manter o conceito de excelência (Nível 6-Capes) da nossa pós-graduação.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Farmacologia da UFC, pelos ensinamentos em cada disciplina e pelo exemplo de dedicação e profissionalismo de cada um.

Às secretárias da pós-graduação Célia e Laura, pela educação e disponibilidade em ajudar a todos os alunos.

A todos os funcionários do Centro de Pesquisas em Biomedicina da UFC, pela prestatividade.

A toda a minha família e amigos pela torcida para a chegada desse momento.

Ao CNPq, CAPES e FUNCAP pelo apoio financeiro.

“Você nunca saberá que resultados virão da sua ação. Mas se você não fizer nada, não existirão resultados.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

Efeito antinecrótico das lectinas ConA e ConBr na lesão de células acinares pancreáticas induzida por sais biliares, álcool e ácido palmitoleico: envolvimento do domínio lectínico

A pancreatite aguda é uma doença inflamatória do pâncreas que envolve uma sequência complexa de eventos fisiopatológicos, muitos dos quais ainda desconhecidos. Dados recentes atribuem maior importância aos eventos que aconteceriam no interior da célula pancreática. A gravidade e a duração do estímulo aplicado às células acinares pancreáticas podem levar à apoptose ou à necrose. Um grande número de estudos demonstraram que as lectinas de *Canavalia ensiformis* (ConA) e *Canavalia brasiliensis* (ConBr) induzem morte celular por apoptose em diversos tipos de células. Contudo não há estudos sobre seus efeitos antinecróticos. Dessa forma, investigamos os efeitos de ConA e ConBr frente à morte de células acinares pancreáticas, induzida pelos principais desencadeadores da pancreatite aguda. As células acinares foram isoladas de pâncreas de camundongos Swiss machos. As células foram previamente incubadas durante 1h com ConA (200 µg/ml) e ConBr (200 µg/ml) seguido da indução das lesões celulares pela administração de SATC (500µM), etanol (850mM) ou APO (100 µM) durante 30 min (T.A). Para avaliar a participação do domínio lectínico de ConA e ConBr, as lectinas foram previamente incubadas, durante 1h a 37°C, com seu açúcar ligante α -metil-manosídeo (α -MM), ou com um açúcar não ligante, D-galactose, ambos na concentração de 0,2M, antes dos protocolos experimentais. Todos os grupos foram incubados por 5 minutos com o marcador nuclear Hoechst 33342 (50 µg/ml) e com o marcador de necrose iodeto de propídeo (IP; 10 µg/ml). Em outra análise, ConA e ConBr conjugadas ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) foram incubadas durante 1h (T.A), com as células acinares. Para a avaliação do efeito de ConA e ConBr no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de células acinares pancreáticas sob administração de SATC, etanol ou APO, as células foram marcadas com Hoechst 33342 e tetrametilrodamina-metiléster (TMRM, corante fluorescente que é prontamente sequestrado pela mitocôndria ativa). Todas as análises foram realizadas no microscópio confocal FluoViewTM 1000 – Olympus. Os resultados mostraram que os grupos SATC, etanol e APO causaram necrose significativa às células, quando comparado com os grupos controles e que o pré-tratamento de ConA e ConBr promoveu proteção significativa ($p < 0,05$) contra a necrose causada pelos três agentes lesivos. Quando as lectinas foram complexadas ao seu açúcar ligante, α -MM, este efeito protetor foi significativamente revertido ($p < 0,05$); não sendo alterado, porém, pelo açúcar não específico D-galactose, evidenciando a participação do domínio lectínico no seu efeito protetor. As lectinas conjugadas com FITC evidenciaram uma marcação nas células acinares a nível de membrana, confirmando a sua interação com carboidratos presentes na superfície dessas células. Na análise do potencial mitocondrial, SATC, etanol e principalmente APO desencadearam intensa despolarização do $\Delta\Psi_m$ das células acinares pancreáticas. O pré-tratamento com ConA preveniu ($p < 0,05$) a disfunção mitocondrial em todos os modelos de lesão, contudo ConBr preveniu essa disfunção na lesão causada por SATC e etanol ($p < 0,05$), sem alterar a disfunção causada por APO. Diante do exposto, ConA e ConBr protegem células acinares pancreáticas contra a necrose induzida por ácido taurolitocólico sulfatado, etanol e APO, tendo seus efeitos mediados pelo domínio lectínico, além da manutenção da integridade da membrana mitocondrial da célula pancreática, fator determinante para evitar o curso da necrose na pancreatite aguda.

Palavras-chave: Pancreatite Necrosante Aguda. Morte celular. Lectinas de Plantas.

ABSTRACT

Effect anti-necrotic of ConA and ConBr lectins in pancreatic acinar cell injury induced by bile salt, alcohol, and palmitoleic acid: involvement of the lectin domain

Acute pancreatitis is an inflammatory disease of the pancreas which involves a complex sequence of pathophysiological events, many of which are still unknown. Recent data give more importance to the events that happen within the pancreatic cell. The severity and duration of the stimulus applied to pancreatic acinar cells may lead to apoptosis or necrosis. A large number of studies have demonstrated that the lectin of *Canavalia ensiformis* (ConA) and *Canavalia brasiliensis* (ConBr) induce cell death by apoptosis in various cell types. However there are no studies on its anti-necrotic effects. Thus, we investigated the effects of ConA and ConBr concerning the death of pancreatic acinar cells, induced by the main triggers of acute pancreatitis. The acinar cells were isolated from the pancreas of male Swiss mice. The cells were pre-incubated with ConA and ConBr for 1h followed by the induction of cell damage by SATC, ethanol or APO administration for 30 min (room temperature, RT). To evaluate the role of the lectin domain of ConBr and ConA, the lectins were preincubated for 1h at 37°C with its alpha-methyl-mannoside (α -MM) ligand sugar, or with a nonbinding sugar, D-galactose, both at a concentration of 0.2M, prior to experimental protocols. All groups were incubated for 5 minutes with the nuclear marker Hoechst 33342 (50 μ g/ml) and with the necrosis marker, propidium iodide (PI; 10 μ g/ml). In another analysis, ConA and ConBr conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) were incubated for 1h (RT) with the acinar cells. To evaluate the effect of ConA and ConBr effect on mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) of pancreatic acinar cells under administration of SATC, ethanol or APO, the cells were stained with Hoechst 33342, and tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM, fluorescent dye that is readily sequestered by active mitochondria). All analyzes were performed using confocal microscope FluoView™ 1000 - Olympus. The results showed that the SATC, ethanol and APO groups caused significant necrosis on cells compared to control groups, and pretreatment ConBr and ConA caused a significant protection against harmful necrosis caused by all three agents. When lectins were complexed to their α -MM ligand sugar, this protective effect was significantly reversed; not being changed, however, by no specific sugar D-galactose, suggesting a participation of the lectin domain in protective effect. Lectins conjugated with FITC showed a marking on acinar cells at the level of membrane, confirming its interaction with carbohydrates present on the surface of these cells. In the analysis of mitochondrial potential, SATC, ethanol and mainly APO triggered intense depolarization of $\Delta\Psi_m$ of pancreatic acinar cells. Pretreatment with ConA prevented mitochondrial dysfunction in all injury models, however ConBr prevented this injury caused by a dysfunction in SATC and ethanol, without changing the dysfunction caused by APO. Given the above, Con A and Con Br protect pancreatic acinar cells against necrosis induced by sulfated tauro lithocholic acid, ethanol and APO with its effects mediated by lectin domain, beyond of the maintenance the integrity of the mitochondrial membrane of pancreatic cell, determinant factor to prevent the course of necrosis in acute pancreatitis.

Keywords: Acute Necrotizing Pancreatitis. Cell Death. Plant Lectins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da porção exócrina e endócrina do pâncreas.....	21.
Figura 2. Representação esquemática do pâncreas exócrino.....	23.
Figura 3. Ativação do tripsinogênio.....	25.
Figura 4. Modelo esquemático de interação de fatores desencadeantes de morte celular na pancreatite aguda.....	30.
Figura 5. Ácidos biliares e metabólitos não-oxidativos do etanol podem induzir morte celular via lesão mitocondrial em células acinares pancreáticas.....	32.
Figura 6. Efeitos dos ácidos biliares e metabólitos não-oxidativos do etanol nas células exócrinas pancreáticas.....	33.
Figura 7. Representação esquemática generalizada do monômero de lectinas de leguminosas obtida do modelo estrutural do monômero da Concanavalina A.....	39.
Figura 8. Representações esquemáticas da ligação de íons e carboidrato a lectinas de leguminosas.....	41.
Figura 9. Estruturas moleculares de monômero de ConA (A), dímero de ConA (B) e tetrâmero de ConA (C).....	43.
Figura 10. Leguminosa <i>Canavalia ensiformis</i> (L.) DC. (Jack bean) (feijão espada).....	44.
Figura 11. Leguminosa <i>Canavalia brasiliensis</i> MART (feijão bravo do Ceará).....	46.
Figura 12. Sequência de aminoácidos da ConA (NAISHMITH; FIELD, 1996) e da ConBr (GRANGEIRO et al., 1997).....	47.
Figura 13. Estrutura global dos tetrâmeros de ConA e ConBr e a localização das quatro subunidades.....	48.
Figura 14. Comparação (por superposição) das estruturas tridimensionais dos tetrâmeros de ConA (magenta) e ConBr (azul e branco).....	48.
Figura 15. Esquema ilustrativo da técnica de isolamento primário.....	55.
Figura 16. Imagem obtida após técnica de isolamento primário das células acinares pancreáticas.....	56.
Figura 17. Quantificação de Necrose.....	58.
Figura 18. Representação esquemática do tratamento das células acinares pancreáticas.....	60.
Figura 19. Imagens do efeito de ConA e ConBr sobre as células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por ácido taurolitocólico sulfatado (SATC).....	63.
Figura 20. Efeito de ConA e ConBr sobre as células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por ácido taurolitocólico sulfatado (SATC).....	64.

Figura 21. Imagens do efeito de ConA e ConBr sobre as células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por etanol.....	65.
Figura 22. Efeito de ConA e ConBr sobre as células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por etanol.....	66.
Figura 23. Imagens do efeito de ConA e ConBr sobre as células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por ácido palmitoleico (APO).....	67.
Figura 24. Efeito de ConA e ConBr sobre as células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por ácido palmitoleico (APO).....	68.
Figura 25. Efeito do açúcar alfa-metil-manosídeo (α -MM) sobre as ações de ConA e ConBr em células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por ácido taurolitocólico sulfatado (SATC).....	69.
Figura 26. Efeito do açúcar alfa-metil-manosídeo (α -MM) sobre as ações de ConA e ConBr em células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por etanol.....	70.
Figura 27. Efeito do açúcar alfa-metil-manosídeo (α -MM) sobre as ações de ConA e ConBr em células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por ácido palmitoleico (APO).....	70.
Figura 28. Efeito do açúcar galactose sobre as ações de ConA e ConBr em células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por ácido taurolitocólico sulfatado (SATC).....	71.
Figura 29. Efeito do açúcar galactose sobre as ações de ConA e ConBr em células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por etanol.....	72.
Figura 30. Efeito do açúcar galactose sobre as ações de ConA e ConBr em células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por ácido palmitoleico (APO).....	73.
Figura 31. Interação de ConA/FITC com células acinares pancreáticas.....	74.
Figura 32. Interação de Con Br/FITC com células acinares pancreáticas.....	74.
Figura 33. Imagens do efeito de ConA e ConBr no $\Delta\Psi_m$ de células acinares pancreáticas sob administração de SATC.....	76.
Figura 34. Continuação. Imagens do efeito de ConA e ConBr no $\Delta\Psi_m$ de células acinares pancreáticas sob administração de SATC.....	77.
Figura 35. Efeito de ConA e ConBr no $\Delta\Psi_m$ de células acinares pancreáticas sob administração de SATC.....	78.
Figura 36. Efeito de ConA e ConBr no $\Delta\Psi_m$ de células acinares pancreáticas sob administração de etanol.....	79.

Figura 37. Efeito de ConA e ConBr no $\Delta\Psi_m$ de células acinares pancreáticas sob administração de etanol.....	80.
Figura 38. Imagens do efeito de ConA e ConBr no $\Delta\Psi_m$ de células acinares pancreáticas sob administração de APO.....	81.
Figura 39. Efeito de ConA e ConBr no $\Delta\Psi_m$ de células acinares pancreáticas sob administração de APO.....	82.
Figura 40. Efeito anti-necrótico das lectinas ConA e ConBr em células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por ácido taurolitocólico sulfatado, etanol ou ácido palmitoleico (modelo hipotético).....	94.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Avaliação do efeito de ConA (200 µg/ml) e ConBr (200 µg/ml) nas células acinares pancreáticas sob administração de SATC, etanol ou APO..... 57.
- Tabela 2.** Investigação do efeito do açúcar α -MM sobre as ações de ConA (200 µg/ml) e ConBr (200 µg/ml) nas células acinares pancreáticas sob administração de SATC, etanol ou APO..... 59.
- Tabela 3.** Investigação do efeito do açúcar galactose sobre as ações de ConA (200 µg/ml) e ConBr (200 µg/ml) nas células acinares pancreáticas sob administração de SATC, etanol ou APO..... 59.
- Tabela 4.** Análise da interação de ConA (200 µg/ml) e ConBr (200 µg/ml) conjugadas ao FITC com as células acinares pancreáticas..... 60.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADH	Álcool-desidrogenase
ANOVA	Análise de variância
Apaf-1	Fator de ativação de peptidase apoptótica 1
APO	Ácido palmitoleico
ATP	Trifosfato de adenosina
(ATP)i	Trifosfato de adenosina intracelular
Ca²⁺	Cálcio
Ca²⁺-ATPase	Bomba de Cálcio-ATPase
CaCl₂	Cloreto de cálcio
CCK	Colecistocinina
CEPA	Comitê de ética em pesquisa animal
ConA	Lectina concanavalina A de <i>Canavalia ensiformis</i>
ConBr	Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>
CONCEA	Conselho nacional de controle da experimentação animal
CYP	Citocromo P450
DMSO	Dimetil sulfóxido
EEAG	Etil éster de ácidos graxos
EEAP	Etil éster de ácido palmitoleico
EPM	Erro padrão da média
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
g	Grama
Gpbar1	Receptor de superfície celular ativado por ácidos biliares
HEPES	4-(2-hidroxietil)- 1- piperazinoetanossulfônico
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IP	Iodeto de propídeo
IP₃R	Receptor de trifosfato de inositol
KCl	Cloreto de potássio
L	Litro
M	Molar
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro

mM	Milimolar
Mn²⁺	Manganês
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
NaCl	Cloreto de sódio
NAD	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidada
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzida
nm	Nanômetros
NaOH	Hidróxido de sódio
NFkB	Fator nuclear kappa B
PA	Pancreatite aguda
PAR-2	Receptor ativado por protease 2
pH	Potencial hidrogeniônico
PSTI	Inibidor da secreção pancreática de tripsina
PTPM	Poros de transição de permeabilidade mitocondrial
RE	Retículo endoplasmático
RyR	Receptor de rianodina
SATC	Ácido taurolitocólico sulfatado
SPINK1	Inibidor de serina-protease, kasal tipo 1
T.A	Temperatura ambiente
TMRM	Tetrametil rodamina metil éster
u.m.a	Unidade de massa atômica
VIP	Polipeptídeo intestinal vasoativo
α	Alfa
α-MM	Alfa-metil-manosídeo
β	Beta
μg	Micrograma
μM	Micromolar
[Ca²⁺]	Concentração de cálcio
[Ca²⁺]_c	Concentração de cálcio citosólico
ΔΨ_m	Potencial de membrana mitocondrial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Anatomia e fisiologia do pâncreas	20
1.2. Porção exócrina do pâncreas	22
1.3. Mecanismos de proteção <i>versus</i> lesão das células acinares pancreáticas	24
1.4. Pancreatite aguda	26
1.5. Morte celular na pancreatite aguda	28
1.6. Papel da mitocôndria na fisiopatologia celular da pancreatite aguda	31
1.7. Produtos naturais como alternativa terapêutica	33
1.8. Lectinas	34
1.9. Lectinas de leguminosas	37
1.10. Lectina isolada de <i>Canavalia ensiformis</i> (L.) DC. (ConA)	41
1.11. Lectina isolada de <i>Canavalia brasiliensis</i> MART (ConBr)	45
2. JUSTIFICATIVA	50
3. OBJETIVOS	51
3.1. Objetivo geral	51
3.2. Objetivos específicos	51
4. MATERIAL E MÉTODOS	52
4.1. Aspectos éticos	52
4.2. Animais	52
4.3. Lectinas vegetais	52
4.4. Aparelhos e instrumentos laboratoriais	53
4.5. Fármacos, soluções e marcadores fluorescentes	53
4.5.1. Fármacos e Reagentes	53
4.5.2. Soluções	53
4.5.3. Marcadores Fluorescentes	54
4.6. Preparação celular e soluções	54
4.7. Isolamento das células acinares pancreáticas	54
4.8. Análise dos efeitos de ConA e ConBr sobre a lesão celular induzida por ácido taurolitocólico sulfatado, etanol ou ácido palmitoleico	56
4.9. Avaliação da participação do domínio lectínico nos efeitos de ConA e ConBr	58
4.10. Observação da interação de ConA e ConBr conjugadas ao FITC com as células acinares pancreáticas	60
4.11. Avaliação do papel de ConA e ConBr no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das células acinares pancreáticas sob administração de SATC, etanol ou APO	61
4.12. Análise estatística	61
5. RESULTADOS	62
5.1. Efeito de ConA e ConBr na necrose induzida por ácido taurolitocólico sulfatado, etanol ou ácido palmitoleico em células acinares pancreáticas	62
5.2. Efeito do açúcar ligante (α -MM) nas ações de ConA e ConBr em células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por ácido taurolitocólico sulfatado, etanol ou ácido palmitoleico	68
5.3. Efeito do açúcar não ligante (galactose) nas ações de ConA e ConBr em células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por ácido taurolitocólico sulfatado, etanol ou ácido palmitoleico	71
5.4. Avaliação da interação de ConA/FITC e ConBr/FITC com as células acinares pancreáticas	73
5.5. Papel de ConA e ConBr no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das células acinares pancreáticas sob administração de SATC, etanol ou APO	74

6. DISCUSSÃO	83
7. CONCLUSÃO.....	93
MODELO HIPOTÉTICO	94
REFERÊNCIAS	95

1. INTRODUÇÃO

1.1. Anatomia e fisiologia do pâncreas

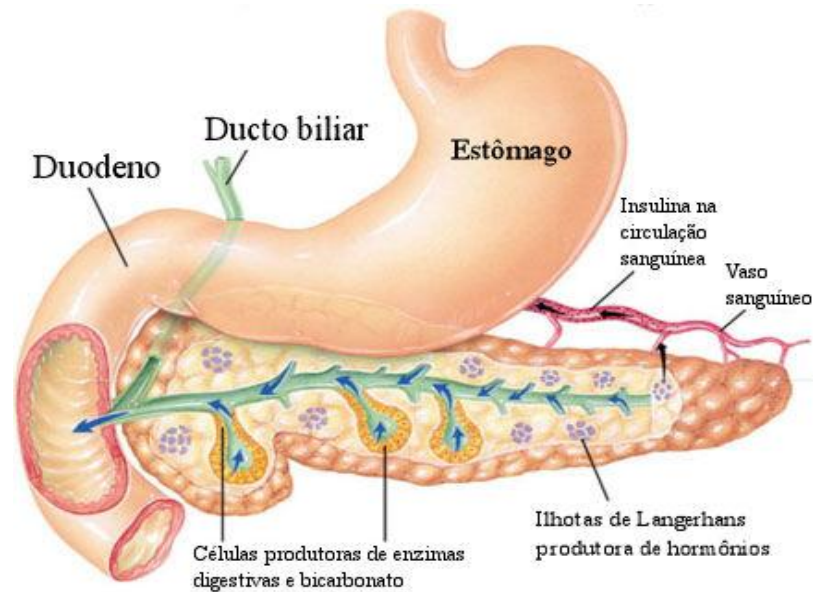
O pâncreas é uma glândula de funções mistas (exócrina e endócrina) (Figura 1), coberta com um tecido fino conectivo, não possuindo uma cápsula verdadeira e situada posteriormente ao estômago, em posição retroperitoneal (THIRUVENGADAM et al., 2012). Localiza-se fixado à parede abdominal posterior, estendendo-se obliquamente e inclinando-se ligeiramente em sentido ascendente da segunda porção do duodeno até ao hilo esplênico. Situa-se anteriormente à veia cava inferior, aorta, veia esplênica e glândula supra-renal esquerda (NETTER, 2008). A função exócrina do pâncreas corresponde a aproximadamente 80% de sua atividade, enquanto os restantes 20% estão envolvidos com função endócrina (THIRUVENGADAM et al., 2012; LEUNG, 2010).

As artérias mesentéricas superior e celíaca são responsáveis pelo suprimento sanguíneo do pâncreas, as quais provêm ao órgão substratos necessários à produção de enzimas digestivas e hormônios. A circulação portal, por sua vez, é responsável pela drenagem venosa deste órgão. Antes de sair do pâncreas, todo o sangue que sai das ilhotas de *Langerhans* entra nos capilares acinares e desta forma as células acinares, particularmente as que circundam as ilhotas, ficam expostas às elevadas concentrações de hormônios insulares, sugerindo uma função reguladora endócrina sobre o pâncreas exócrino (WILLIAMS, 2005).

A inervação pancreática realiza-se de um modo relativamente simples, as fibras parassimpáticas provêm do nervo vago enquanto as fibras simpáticas têm origem, na sua maioria, no plexo celíaco e em menor proporção no plexo mesentérico anterior, pela região posterior do lobo direito (MOORE; DALLEY, 2007; KHOKHAR; SEIDNER, 2004). A secreção de enzimas, eletrólitos e água está sob controle do sistema nervoso autônomo, bem como de hormônios gastrointestinais como a colecistocinina (CCK) e a secretina (BOLLEN et al., 2007). O sistema nervoso entérico, que consiste numa rede de corpos celulares e respectivos neurônios localizados no tubo digestivo permitem uma regulação local, em comunicação com o sistema nervoso central, mas independente do mesmo - ou a partir de fibras nervosas parassimpáticas derivadas do nervo vago (HERDT, 2007).

As enzimas digestivas são produzidas no interior das células acinares pancreáticas e são drenadas principalmente pelo ducto de Wirsung, que se estende desde a cauda do pâncreas até a ampola de Vater. As enzimas são armazenadas dentro das células acinares sob a forma de zimogênios (precursores inativos que são ativados através da ação de outras substâncias) a fim de evitar a autodigestão pancreática.

Figura 1. Representação esquemática da porção exócrina e endócrina do pâncreas.



(Fonte: www.msd.com.br)

Uma vez desencadeados sistemas neuro-humorais, os grânulos de zimogênio fundem-se com a membrana apical da célula e são secretados nos ductos do órgão sendo posteriormente ativados no intestino, contribuindo assim com o processo de digestão dos alimentos (THIRUVENGADAM et al., 2012). A glândula secreta cerca 1500 a 3000 ml de fluido alcalino iso-osmótico ($\text{pH} > 8$) por dia, contendo muitas enzimas e zimogênios (THIRUVENGADAM et al., 2012).

Além da função exócrina, o pâncreas desempenha uma importante função endócrina (WILLIAMS, 2005), composta por diversos tipos celulares que secretam fatores neuro-hormonais, os quais intervêm notoriamente no controle glicêmico (TALUKDAR; SWAROOP-VEGE, 2011). O conjunto de células que formam a porção endócrina do pâncreas denomina-se ilhotas de *Langerhans*, sendo estas distribuídas por toda a glândula, mas são relativamente concentradas na cauda do pâncreas, situadas no parênquima pancreático (WANG et al., 2009). As ilhotas de *Langerhans* contêm vários tipos de células com funções diferentes (HERDT, 2007), cerca de 75% a 80% são células beta (ou células B), produtoras de insulina, 10% a 20% são células alfa (ou células A), produtoras de glucagon, cerca de 5% são células delta (ou células D) que contêm somatostatina e há ainda as células F ou PP produtoras de polipeptídeo pancreático (HEIDT et al., 2009). Os hormônios pancreáticos, elaborados e secretados pelas ilhotas de *Langerhans*, são sintetizados sob a forma de precursores polipeptídicos, os quais são posteriormente clivados e ligam-se a

receptores de membrana na superfície das células, de forma a exercerem as suas ações biológicas (CORGIER, 2002).

1.2. Porção exócrina do pâncreas

A unidade funcional do pâncreas exócrino é constituída por ácinos e ductos, como mostrado na Figura 2. A estrutura do ácino consiste em aglomerados de células epiteliais secretoras com um lúmen no centro, denominado canalículo intercelular. Nessa região se inicia o sistema ductal que se estende até o duodeno. As principais funções do pâncreas exócrino são: secreção de bicarbonato (HCO_3^-), que tem o papel de neutralizar o pH ácido do conteúdo gástrico que flui para o interior do duodeno, além das funções de síntese, armazenamento e secreção de enzimas digestivas (ANAND; PARK; WU, 2012; CULLEN; MACLACHLAN, 2001).

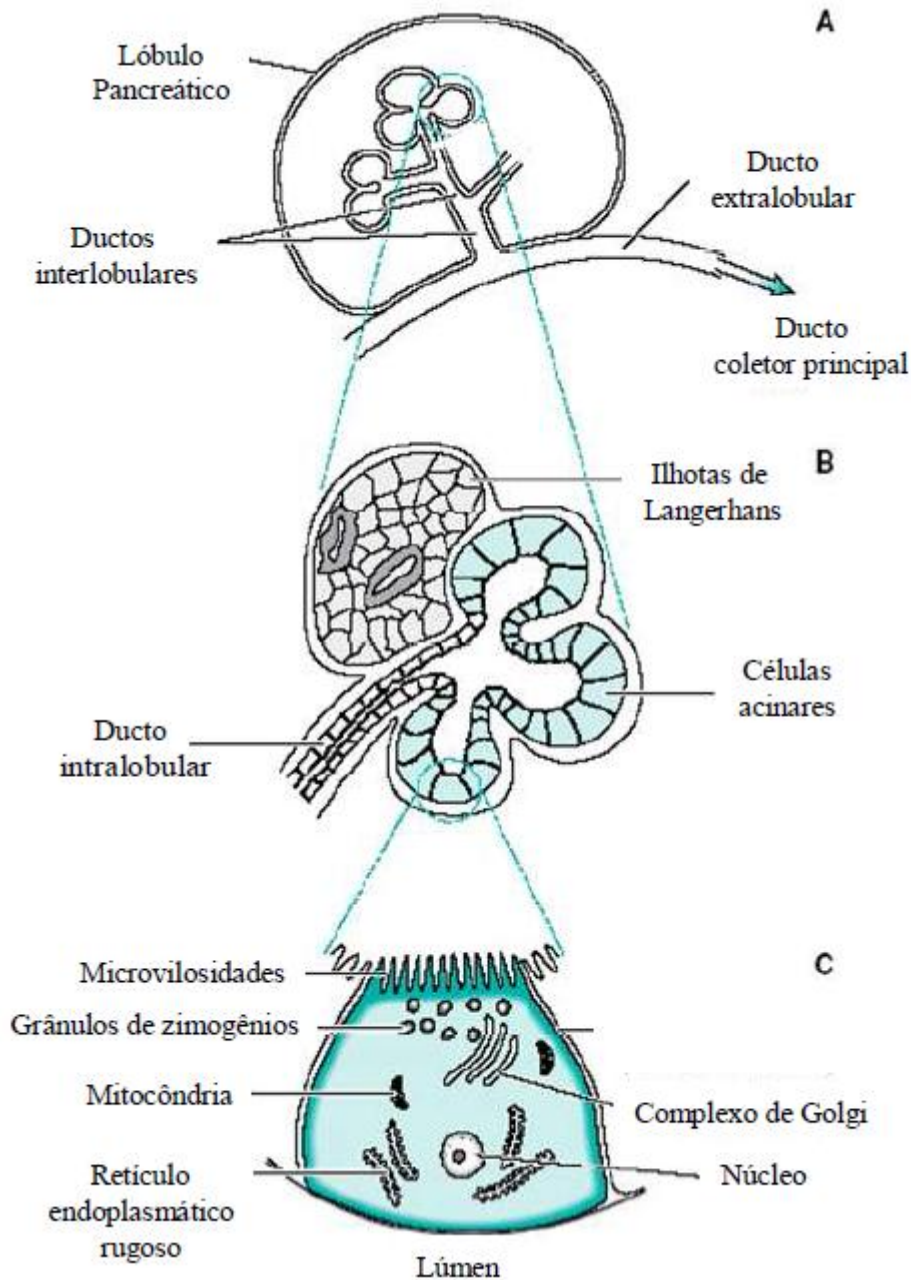
As células acinares, que podem ser esféricas, tubulares ou irregulares (OMARY et al., 2007; PANDOL, 2010) possuem duas porções distintas de membrana: a membrana basolateral, que é mais extensa e localizada na periferia acinar, e a membrana apical, que representa menos de 10% da área total da célula, estando voltada para o lúmen central. As células acinares pancreáticas são muito ricas em RNA, indicando intensa atividade de síntese proteica. A síntese das enzimas ocorre nos ribossomos do retículo endoplasmático, posteriormente transportadas em vesículas para o aparelho de Golgi e, então, separadas em diferentes grupos, segundo a sua função. As enzimas digestivas são armazenadas em grânulos de zimogênio contidos na região apical da célula acinar (OMARY et al., 2007). Nas microvilosidades dessa região e no citoplasma subjacente à membrana plasmática apical residem filamentos de actina que estão envolvidos na exocitose do conteúdo dos grânulos (MUALLEM, et al., 1995; O'KONSKI; PANDOL, 1990).

Na membrana basolateral existem receptores para hormônios e neurotransmissores que estimulam a secreção dessas enzimas (PANDOL, 2010; WILLIAMS, 2001). Dessa forma, os ácinos liberam os conteúdos de seus grânulos secretórios nos ductos intralobulares, alcançando os ductos interlobulares, em seguida os extralobulares e finalmente os ductos pancreáticos acessório e principal (ducto coletor principal). Na sua terminação, o ducto pancreático acopla-se ao colédoco para desembocar no duodeno por um óstio comum, o esfíncter de Oddi (LEUNG; IP, 2006).

O suco pancreático resultante é produzido principalmente em resposta à presença de quimo nas porções superiores do intestino delgado. O controle da secreção pancreática é feito principalmente por reguladores neuro-hormonais como colecistocinina (endócrino),

acetilcolina e outros peptídeos incluindo secretina, polipeptídeo intestinal vasoativo (PIV) e angiotensina II.

Figura 2. Representação esquemática do pâncreas exócrino.



A figura representa esquematicamente: um lóbulo pancreático indicando o sistema de ductos (A), a relação de uma unidade exócrina e uma ilha de Langerhans (B) e uma célula acinar (C). Adaptado de SMITH; MORTON, 2001.

As características do suco pancreático são determinadas, em grande parte, pelos tipos de alimento contidos no quimo. As principais enzimas digestivas encontradas no suco pancreático são a tripsina, quimiotripsina, carboxipolipeptidases, ribonucleases, desoxirribonucleases (enzimas proteolíticas), amilase pancreática, lipase pancreática, esterase e fosfolipases (CHOWDHURY; GUPTA, 2006). Conforme anteriormente citado, as enzimas proteolíticas encontram-se sob a forma de proenzimas inativas (tripsinogênio, quimiotripsinogênio, procarboxipolipeptidases) e não se tornam ativas antes de serem excretadas no intestino, pois podem digerir o próprio pâncreas. Assim, as mesmas células que secretam as enzimas proteolíticas no interior dos ácinos, secretam também outras substâncias, denominadas inibidores da tripsina, que são armazenados no citoplasma das células glandulares que circundam os grânulos de enzimas e previnem a ativação da tripsina tanto no interior das células secretoras quanto nos ductos do pâncreas. Contudo, na vigência de fatores que culminam em intensa lesão do pâncreas, como na situação em que o ducto pancreático principal torna-se bloqueado, impedindo a liberação dos zimogênios para o duodeno, grandes quantidades de secreção pancreática armazenam-se nas áreas lesadas da glândula. Embora o pâncreas possua mecanismos capazes de prevenir a ativação intracelular de zimogênios e subsequente autodigestão, em condições de lesão pancreática, os mecanismos protetores são pouco eficientes; assim, as secreções pancreáticas tornam-se rapidamente ativas, podendo levar a digestão do pâncreas, originando a condição denominada pancreatite aguda (PA) (WILLIAMS, 2005; HERDT, 2007).

1.3. Mecanismos de proteção *versus* lesão das células acinares pancreáticas

A ativação dos zimogênios produzidos e liberados pelas células acinares inicia-se no duodeno quando a enzima enteroquinase ativa o tripsinogênio (Figura 3) (PAPACHRISTOU; WHITCOMB, 2005; FELDERBAUER et al.; 2005). Este se torna tripsina através da clivagem de uma cadeia curta de peptídeos chamada peptídeo de ativação do tripsinogênio (PAPACHRISTOU; WHITCOMB, 2005). A tripsina é uma enzima crítica no processo da pancreatite por promover a sua própria ativação, bem como a de outras enzimas digestivas como quimotripsinogênio, pró-carboxipeptidase e pró-elastase, através de clivagem enzimática (PAPACHRISTOU; WHITCOMB, 2005; PANDOL, 2005; FELDERBAUER et al.; 2005).

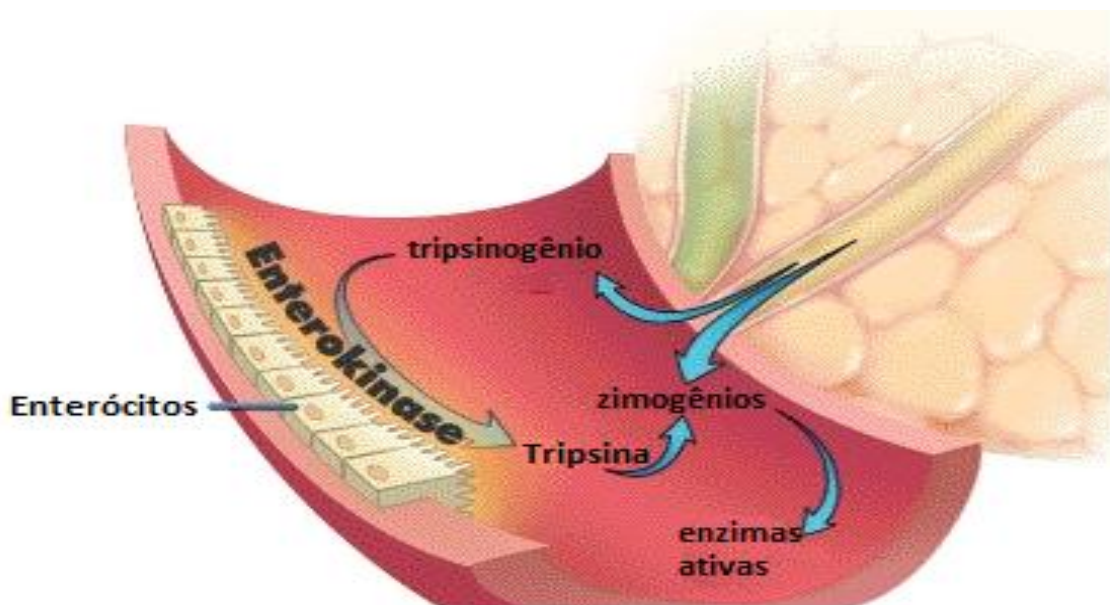
Existem diversos mecanismos protetores intracelulares que evitam a ativação destas enzimas dentro do tecido pancreático, prevenindo assim o surgimento da pancreatite aguda (BHATIA et al.; 2005), dentre esses mecanismos estão a síntese de tripsina a partir de

zimogênios inativados, a compartimentalização e vacuolização dos zimogênios, o controle da concentração intracelular de cálcio e a presença, dentro da célula acinar, de um inibidor de serina-protease, a Kasal tipo 1 (SPINK1), um inibidor específico da tripsina (inibidor da secreção pancreática de tripsina – PSTI) capaz de impedir em cerca de 20% a atividade desta enzima através da inibição competitiva do domínio catalítico da mesma (HIROTA; OHMURAYA; BABA, 2006; PANDOL et al., 2007; FROSSARD; STEER; PASTOR, 2008). Outro mecanismo é a inativação da tripsina por clivagem, seja por autólise ou por ações da mesotripsina e enzima Y (SAHIN-TOTH, 2001).

Quando falha um ou mais dos mecanismos fisiológicos de secreção das enzimas digestivas ou dos mecanismos protetores citados, dá-se início à cascata de ativação das enzimas digestivas, conduzindo a eventos intracelulares com lesão e ruptura das células acinares, permitindo a exposição do tecido pancreático a essas enzimas ativas e resultando nos efeitos inflamatórios da PA (BHATIA et al., 2005; PANDOL, 2010).

Alguns estudos apontam como possíveis responsáveis pela ativação prematura do tripsinogênio a ativação da enzima ATPase apical, a redução do pH, hidrolases e a ruptura do citoesqueleto (BHATIA et al.; 2005; FELDERBAUER et al.; 2005). Três elementos chaves também importantes para esta ativação são o cálcio, a enzima catepsina B e a ativação precoce de NFκB, um importante fator de transcrição que controla a expressão de citocinas inflamatórias (CHAN; LEUNG, 2005; FELDERBAUER et al.; 2005).

Figura 3. Ativação do tripsinogênio.



Fonte: Adaptado de PANDOL (2010).

A ativação intracelular de enzimas digestivas requer acidificação dos compartimentos celulares (BHATIA et al., 2005) que acontece através da ATPase vacuolar, assim, os inibidores desta ATPase evitam a ativação das enzimas digestivas. O cálcio intracelular é um importante mediador de dano e morte celular e está envolvido na ativação de enzimas digestivas intracelulares e na resposta inflamatória quando ocorrem elevações anormais do seu nível citosólico (PANDOL, 2005; FELDERBAUER et al.; 2005). A catepsina B é uma hidrolase lisossomal intracelular que pode clivar o peptídeo ativo do tripsinogênio e ativá-lo. Isto pode acontecer teoricamente se ocorrer uma co-localização intracelular de catepsina B com tripsinogênio em lisossomos vizinhos mediando a ativação sob certas condições como, por exemplo, a presença de pH ácido (BHATIA et al., 2005; FELDERBAUER et al.; 2005).

A tripsina apresenta outras funções importantes que vão além da ativação das enzimas digestivas, podendo participar na regulação do processo inflamatório particularmente em duas situações: a) na clivagem e ativação do receptor ativado por protease (PAR-2), que reduz o dano pancreático pela atenuação dos sinais pró-inflamatórios que ocorrem dentro da célula acinar (PANDOL, 2005) e b) na regulação da ICAM-1, uma molécula de adesão endotelial necessária para o transporte de leucócitos do espaço intravascular para os tecidos inflamados, apresentando maior expressão no pâncreas e nos pulmões. No pulmão a sua expressão pode ser ainda mais intensa e estar associada ao aumento do infiltrado leucocitário neste órgão. No tecido pancreático provoca a diminuição da perfusão microvascular pelo bloqueio ao fluxo sanguíneo mediado pelo acúmulo de leucócitos resultando em isquemia e necrose pancreática. Dessa forma, a tripsina pode apresentar duas funções opostas: em quantidades pequenas pode induzir uma resposta protetora através do PAR-2, enquanto que em quantidades maiores desencadeia a cascata inflamatória da pancreatite (PANDOL, 2005).

1.4. Pancreatite aguda

As doenças pancreáticas foram responsáveis por mais de 27.077 casos hospitalares no Brasil em 2006, com mais de 1.400 óbitos por ano, o que representou um custo financeiro de R\$ 12 milhões naquele ano (DE CAMPOS et al., 2008; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS, 2006). No ano de 2010, ocorreram 22.872 mil internações por pancreatite e outras doenças do pâncreas, o que representa aproximadamente 2% do total de internações por doenças do aparelho digestivo ocorridas no referido ano (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). No Brasil, não há dados oficiais sobre a prevalência das doenças pancreáticas, contudo, segundo dados do Ministério da Saúde, somente entre os anos de 2008 a 2010, foram registrados mais de 66.234 internações decorrentes de doenças do pâncreas.

Este quantitativo representa aproximadamente 2,2% de todas as internações por doenças do aparelho digestivo no período, com um custo aproximado de R\$ 42 milhões aos cofres públicos (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

A pancreatite aguda (PA) apresenta um espectro clínico bastante amplo, caracterizada por intensa dor abdominal acompanhada por elevação sérica de enzimas pancreáticas, podendo variar de um quadro leve associado ao edema pancreático, até quadros graves com extensa necrose pancreática, sendo a evolução e o quadro clínico relacionados com a intensidade e extensão da lesão pancreática e à resposta inflamatória sistêmica a esta lesão (FROSSARD; STEER; PASTOR, 2008).

A pancreatite aguda é, portanto, uma doença inflamatória do pâncreas que envolve uma sequência complexa de eventos fisiopatológicos, muitos dos quais ainda desconhecidos. Essa doença desenvolve-se rapidamente, podendo levar a complicações fatais como insuficiência pulmonar, renal e circulatória (HEGYI et al., 2011). Dependendo da severidade e da duração, a pancreatite apresenta-se sob uma variedade de formas clínicas. Pode ser caracterizada como uma doença inflamatória moderada, autolimitada, com pouca necrose das células acinares; nesse caso, é classificada como pancreatite aguda edematosa. Em casos avançados, a pancreatite torna-se grave e algumas vezes fatal devido à maciça necrose acinar e hemorragia pancreática, sendo, nesse caso, denominada pancreatite aguda hemorrágica necrosante. A maioria dos casos, sob ponto de vista fisiopatológico, se apresenta como pancreatite edematosa (80-85%), contudo 15% a 20% pode se apresentar sob a forma necro-hemorrágica (PAPACHRISTOU; WHITCOMB, 2005; FROSSARD et al., 2008; PANDOL et al., 2007). A mortalidade na pancreatite necro-hemorrágica é em torno de 10% a 30%, dependendo da ocorrência de necrose infectada e de falência de órgãos (FROSSARD et al., 2008; PANDOL et al., 2007; FOLCH et al., 2000). Além disso, vários episódios de pancreatite aguda podem levar a um quadro de pancreatite crônica, caracterizada por fortes dores abdominais e progressiva fibrose, conduzindo à insuficiência pancreática (FRULLONI et al., 2010).

Apesar dos estudos exaustivos, inúmeras lacunas persistem na fisiopatologia da pancreatite aguda, sendo ainda uma questão controversa (LONGO et al., 2011). Entre os vários fatores etiológicos da PA, o cálculo biliar e a ingestão de álcool constituem aqueles mais frequentes, sendo que os mecanismos exatos de como estes agentes iniciam a pancreatite ainda não são bem compreendidos. Outras causas menos frequentes incluem medicamentos, hipertrigliceridemia, defeitos genéticos, tumores, infecções virais, hipercalcemia e pós-colangiopancreatografia endoscópica retrógrada. Acredita-se que a exposição a algum destes fatores causais desencadeia uma cascata de eventos patológicos, resultando nas alterações

locais e sistêmicas da pancreatite (LONGO et al., 2011; THIRUVENGADAM et al., 2012). Foram propostas como mecanismos fisiopatológicos a lesão da microcirculação, quimiotaxia de leucócitos, a liberação de citocinas pró e antiinflamatórias, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, diminuição dos níveis de adenosina trifosfato (ATP), aumento sustentado de Ca^{2+} no interior das células acinares e a translocação bacteriana para o pâncreas e circulação sistêmica (FELDMAN; FRIEDMAN; BRANDT, 2010; HUANG et al., 2014).

Em vista da dificuldade de compreensão dos mecanismos envolvidos em tal patologia, nenhuma terapêutica clínica específica demonstrou diminuição significativa na mortalidade da pancreatite aguda grave (PANDOL et al., 2007; LIU et al., 2006). O tratamento ainda consiste na terapia intensiva focada nos sintomas e nas complicações locais e sistêmicas da pancreatite como dor, infecção, necrose e disfunção múltipla de órgãos (GALLAGHER et al., 2004). Nas complicações locais estão indicados procedimentos cirúrgicos, endoscópicos ou radiológicos quando há necroses infectadas, abscessos ou pseudocistos (GALLAGHER et al., 2004).

Na tentativa de melhor explicar a fisiopatologia da doença, dados recentes têm atribuído maior importância aos eventos que aconteceriam no interior da célula pancreática (HUANG et al., 2014; BOOTH et al., 2011). Embora uma gama de estudos esteja focada em estudar tal fisiopatologia, os mecanismos através dos quais as diferentes causas levam à PA não são ainda conhecidos por completo, mas as evidências demonstram que, tanto nos humanos como em modelos animais, a doença estabelecida cursa no mesmo sentido independentemente da causa traduzindo-se em inflamação, edema e necrose celular do pâncreas (LONGO et al., 2011).

1.5. Morte celular na pancreatite aguda

O pâncreas exócrino é composto principalmente de células acinares, que compreendem mais de 90% da glândula e são consideradas o principal foco de lesão local em PA. Há mais de uma década foram propostas hipóteses de que as alterações da homeostase de Ca^{2+} nas células acinares pancreáticas são subjacentes ao desenvolvimento de lesão pancreática (WARD et al., 1995). Os estudos subsequentes têm confirmado o papel central do Ca^{2+} na patogênese da PA, induzida por vários agentes, incluindo hiperestimulação por ceruleína (KRUGER; ALBRECHT; LERCH, 2000; RARATY et al., 2000), sais biliares (KIM et al., 2002; VORONINA et al., 2002), metabólitos não-oxidativos do álcool (etil ésteres de ácidos graxos) e ácidos graxos (CRIDDLE et al., 2004; BOOTH et al., 2006). Elevações de Ca^{2+} sustentadas induzidas por estes diversos agentes podem levar à ativação prematura de Ca^{2+} nos grânulos de zimogênio, formação de vacúolo e necrose acinar

(KRUGER; ALBRECHT; LERCH, 2000; RARATY et al., 2000; BOOTH et al., 2011). Em um cenário clínico a extensão da necrose determina a severidade da doença e pior prognóstico.

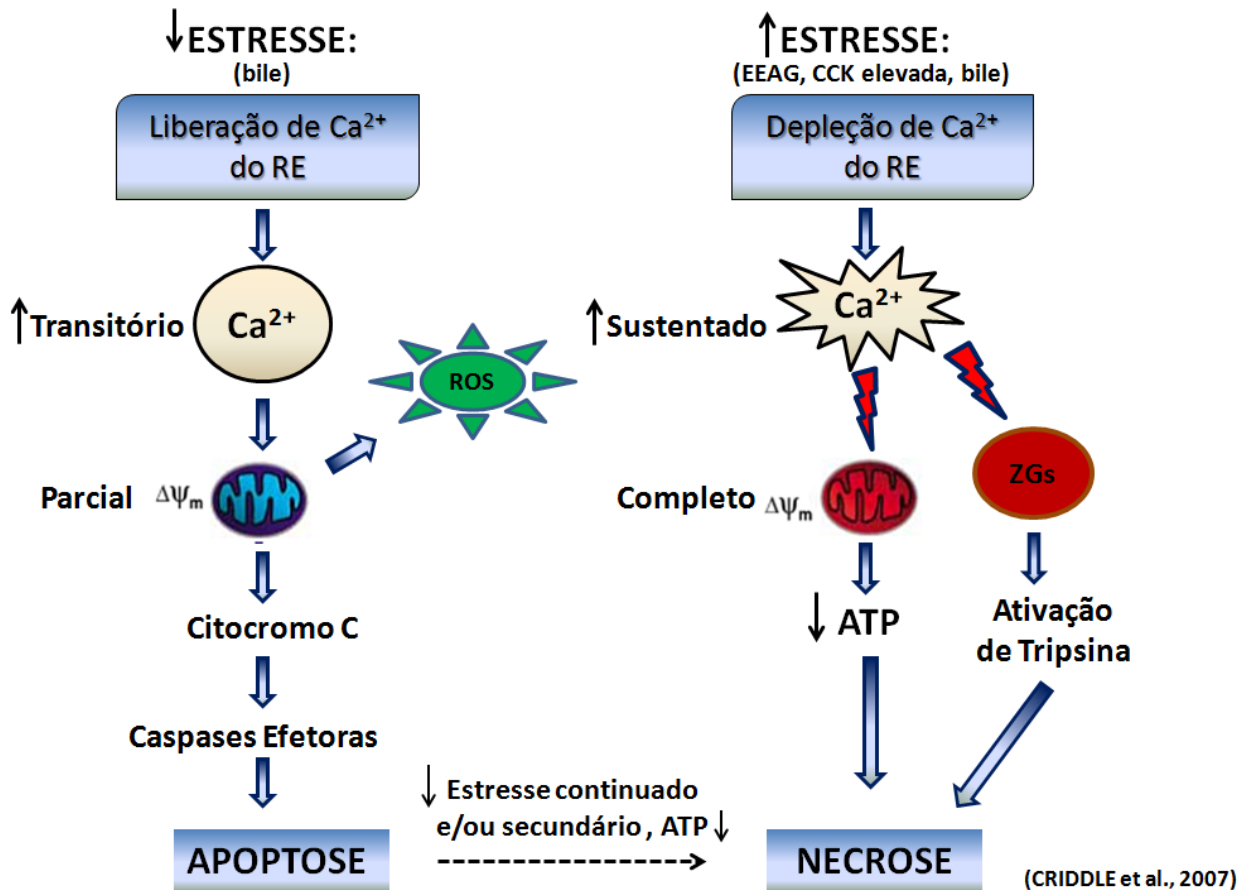
A gravidade e a duração do estímulo aplicado às células acinares pancreáticas são uma grande influência sobre a modalidade de morte celular (CRIDDLE, et al., 2007). A apoptose e necrose representam formas distintas de morte celular (MELINO; KNIGHT; NICOTERA, 2005). A apoptose ou morte celular programada é um tipo de morte celular regulada geneticamente, e caracteriza-se por alterações morfológicas, bioquímicas, bem como alterações genéticas moleculares (MARENINOVA et al., 2006). O processo de apoptose atua como um mecanismo homeostático da morfogênese celular, tendo participação relevante na remoção de células danificadas, infectadas ou potencialmente neoplásicas (WANG et al., 2012). A degradação celular e as alterações morfológicas observadas em células apoptóticas são decorrentes da ativação de caspases, que são proteases específicas de aspartato contendo cisteína, que após estímulo apoptótico são ativadas por clivagem proteolítica (ESTAQUIER et al., 2012).

A necrose é caracterizada como uma resposta passiva ao dano celular e apesar de alguns estudos sugerirem que ela também possa ser regulada geneticamente, não há um mecanismo molecular bem esclarecido, sendo considerada um mecanismo descontrolado de morte celular (BHATIA, 2004). As características celulares do processo de necrose são: aumento de volume celular, tumefação de algumas organelas citoplasmáticas e agregação da cromatina, com conseqüente liberação do conteúdo celular, o que causa dano às células vizinhas e uma reação inflamatória local (BRÖKER; KRUYT; GIACCONE, 2005; RUBIN et al., 2010).

Foi mostrado recentemente que as espécies reativas de oxigênio (EROs) são geradas de forma aguda pela mitocôndria em resposta aos ácidos biliares em células acinares pancreáticas humanas e de roedores, como resultado da sobrecarga de Ca^{2+} nessa organela (BOOTH et al., 2011). A conseqüência da elevação de EROs nestas células é a indução de apoptose, que atua possivelmente como um mecanismo protetor endógeno, com o propósito de evitar a morte por necrose e facilitar sua remoção sem desenvolvimento de inflamação (CRIDDLE et al., 2006). No entanto, quando os níveis de Ca^{2+} intracelular e/ou produção de EROs são sustentados, a célula é induzida à necrose e a produção de energia pela mitocôndria é prejudicada. Esse prejuízo da função mitocondrial pode culminar com a redução dos níveis de ATP na célula, esse fenômeno parece ser o ponto de partida para o desenvolvimento da necrose, pois inibe processos como a ativação de caspases dependente de ATP (com

subsequente apoptose), e a extrusão de Ca^{2+} dependente de ATP, que é necessária para o retorno dos níveis de Ca^{2+} aos valores basais, mantendo altos os níveis de Ca^{2+} citosólico.

Figura 4. Modelo esquemático de interação de fatores desencadeantes de morte celular na pancreatite aguda.



Aumentos oscilatórios globais de Ca^{2+} , desencadeado pela liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático (RE) por estresse moderado à célula, como por exemplo, bile em pequenas quantidades, causa despolarização mitocondrial transiente e promove apoptose, quando fatores adicionais, tais como geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), estão presentes. Entretanto, insultos mais severos à célula, como causados por etil ésteres de ácidos graxos (EEAGs) ou colecistocinina (CCK) elevada, causam depleção dos estoques de Ca^{2+} do RE e sustentadas elevações patológicas de Ca^{2+} , através da entrada extracelular excessiva desse íon, que leva a uma inibição irreversível da função mitocondrial, com depleção de ATP e parada da atividade das bombas de Ca^{2+} que são dependentes de energia, levando a uma ativação prematura das enzimas pancreáticas digestivas. O efeito final destas mudanças, induzidas por precipitadores conhecidos da pancreatite aguda, é a morte necrótica da célula acinar. Fonte: CRIDDLE et al (2007).

Dessa forma, evitar a morte da célula acinar por necrose constitui o objetivo fundamental contra o desenvolvimento da pancreatite aguda (RARATY et al., 2005). A figura

4 apresenta um modelo esquemático de interação de fatores desencadeantes de morte celular na pancreatite aguda.

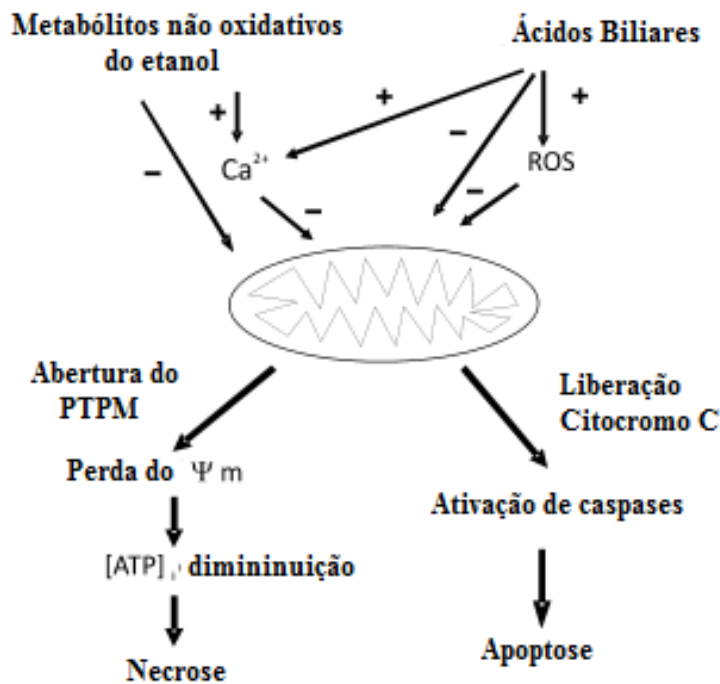
1.6. Papel da mitocôndria na fisiopatologia celular da pancreatite aguda

O pâncreas exócrino sintetiza e secreta grandes quantidades de proteínas, e para este fim necessita de fornecimento de grandes quantidades de energia. A organela para este processo de transdução energética é a mitocôndria. Essencialmente, a mitocôndria transforma energia química derivada a partir da oxidação de substratos em um gradiente de prótons eletroquímicos através de sua membrana interna ($\Delta\Psi_m$). O potencial de membrana mitocondrial pode então ser usado para síntese de trifosfato de adenosina (ATP) e para armazenamento de Ca^{2+} (ODINOKOVA et al., 2009). O ATP é necessário para praticamente todos os processos dependentes de energia no metabolismo da célula acinar pancreática, dessa forma a disfunção mitocondrial tem sido implicada na lesão tecidual da pancreatite tão cedo quanto os métodos para investigação do papel das mitocôndrias tornaram-se disponíveis (SCHILD et al., 1999). Diversas vias na função mitocondrial têm sido implicadas na pancreatite. A disfunção da membrana mitocondrial externa permite o extravasamento de proteínas maiores do espaço entre as membranas interna e externa, incluindo citocromo C, que por sua vez leva à ativação de caspases no citosol. O citocromo C citosólico, através de um mecanismo que envolve diferentes catepsinas, induz apoptose (WARTMANN et al., 2010). A apoptose, como visto anteriormente, não induz a liberação descontrolada de proteases digestivas ativas e citocinas para o espaço intersticial, sendo frequentemente seguida de regeneração tecidual.

Por outro lado, danos na membrana externa também levam a um colapso da membrana interna ($\Delta\Psi_m$), com subsequente esgotamento da produção de energia e necrose da célula acinar e do tecido pancreático como um todo. A necrose não somente se propaga para células vizinhas como também atrai células inflamatórias que, por sua vez, determinam a gravidade definitiva da doença (MAYERLE et al., 2005). A despolarização da membrana mitocondrial interna, que se segue fisiológica à estimulação por colecistocinina (CCK), leva à abertura dos poros de transição de permeabilidade mitocondrial (PTPM), a uma redução na geração de espécies reativas de oxigênio e a uma prevenção da liberação de citocromo C, situações muito úteis no contexto da pancreatite (ODINOKOVA et al., 2009; HALANGK et al., 2009). Esse contexto muda quando a abertura dos PTPM não é transitória (fisiológica), mas sustentada, o que permite uma entrada não-seletiva de moléculas acima de 1,5 kDa através da membrana

interna e para a matriz mitocondrial, causando tumefação de toda a organela, colapso da $\Delta\Psi_m$ e invariavelmente necrose celular (HALANGK et al., 2009) (Figura 5).

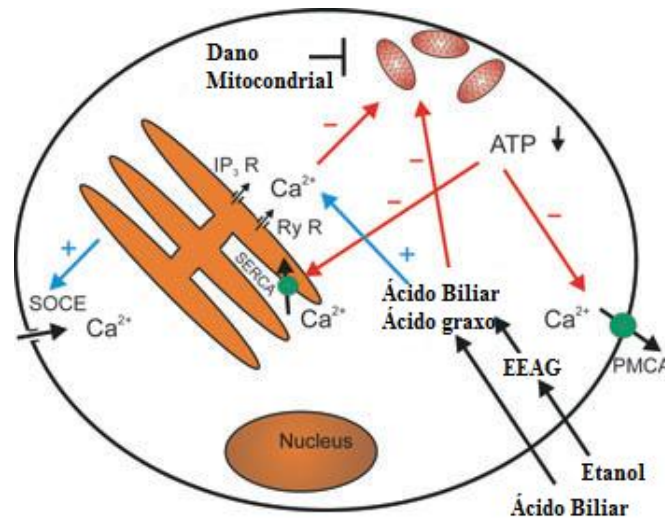
Figura 5. Ácidos biliares e metabólitos não-oxidativos do etanol podem induzir morte celular via lesão mitocondrial em células acinares pancreáticas.



Ácidos biliares e metabólitos não-oxidativos do etanol podem danificar a mitocôndria de células acinares pancreáticas através da elevação sustentada de Ca^{2+} e aumento na produção de EROs, ou via toxicidade mitocondrial direta. A lesão mitocondrial pode induzir apoptose via liberação de citocromo C e ativação da cascata de caspases, ou necrose através da abertura de PTPM. Fonte: Adaptado de MALÉTH et al. (2013).

A figura 6 ilustra como os ácidos biliares e os metabólitos não oxidativos do etanol podem induzir elevação sustentada de Ca^{2+} intracelular, com conseqüente dano mitocondrial e posterior diminuição de ATP, fatores determinantes para a determinação do curso da necrose celular no quadro de pancreatite aguda.

Figura 6. Efeitos dos ácidos biliares e metabólitos não-oxidativos do etanol nas células exócrinas pancreáticas.



Os ácidos biliares e os metabólitos não oxidativos do etanol podem induzir elevação sustentada de Ca^{2+} intracelular via liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático (RE) e indução de influxo extracelular de Ca^{2+} . A elevação sustentada da concentração de Ca^{2+} intracelular e o efeito lesivo mitocondrial direto dos ácidos biliares e metabólitos não oxidativos do etanol induzem dano mitocondrial e depleção (ATP). A depleção de ATP irá contribuir para a manutenção da elevação da concentração de Ca^{2+} intracelular. Fonte: Adaptado de MALÉTH et al. (2013).

1.7. Produtos naturais como alternativa terapêutica

O uso dos produtos naturais iniciou-se há milhares de anos por várias populações com o intuito de tratar diversas patologias. Apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna, os produtos naturais continuam sendo utilizados e, estima-se que, cerca de 30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivados de metabólitos secundários (CALIXTO, 2005; VEIGA-JUNIOR; MELLO, 2008).

Produtos naturais têm uma longa e bem sucedida história nos processos de descoberta e desenvolvimento de fármacos. Plantas, insetos, microrganismos e organismos marinhos exibem complexa interação com o meio ambiente e produzem metabólitos utilizados para sua sobrevivência. Como consequência do papel biológico para os organismos produtores, esses metabólitos podem exibir amplo espectro de aplicação biológica (PUPO et al., 2006).

O Brasil é o país com maior potencial para pesquisa com espécies vegetais, pois detém a maior e mais rica biodiversidade do planeta, distribuída em seis biomas distintos (NOLDIN; ISAIAS; CECHINEL FILHO, 2006). O país tem mais de 56.000 espécies de plantas distribuídas em cinco diferentes ecossistemas, constituindo cerca de 19% da flora mundial (GIULIETTI et al., 2005). Entretanto, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas

com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, propagadas por usuários ou comerciantes. O panorama para a fitoquímica é muito mais importante e decisivo para o Brasil, num futuro próximo, ao considerarmos sua grande riqueza vegetal ainda sem estudo, e as possibilidades que observamos para o desenvolvimento de novos medicamentos (KLEIN et al., 2010). O Brasil com uma extensão territorial de 851 milhões de hectares, possui aproximadamente 463 milhões de hectares de área florestal total, ou seja, 54,4% da área total brasileira é coberta por floresta (BRASIL. SERVIÇO FLORESTAL BRASILEIRO, 2013), verdadeiro patrimônio genético, científico, tecnológico, econômico e cultural que precisa ser conhecido, pesquisado, valorizado e explorado racional e criteriosamente.

A utilização de plantas medicinais está em contínua expansão em nível mundial. A crescente busca por agentes terapêuticos derivados de espécies vegetais justifica-se pelo surgimento de doenças ainda sem tratamento apropriado e pelo crescimento do conhecimento científico a respeito dos fitoterápicos, como importantes alternativas terapêuticas (BALUNAS; KINGHORN, 2005). Dessa forma, a importância da diversidade química dos produtos naturais para a descoberta de novos fármacos tem despertado interesse da indústria farmacêutica. Em consonância com este fato, atualmente, os produtos naturais com atividade biológica lideram as estruturas que irão se tornar as principais fontes de novos agentes com potencial farmacológico.

1.8. Lectinas

Dentro do grande leque de produtos naturais já caracterizados com importantes atividades biológicas destacam-se as lectinas, que formam uma classe heterogênea de proteínas que apresentam pelo menos um sítio de ligação não catalítico, pelo qual se ligam de maneira reversível e específica a mono ou oligossacarídeos, sendo este sítio denominado domínio lectínico (SHARON; LIS, 1995) e que estão envolvidas em diversos fenômenos, dentre esses, destacam-se os processos de fertilização, embriogênese, migração celular, defesa imunológica, atividade pró-apoptótica em células tumorais, dentre outros (SHARON; LIS, 2004).

O trabalho pioneiro referente ao estudo de lectinas originou-se no final do século XIX, com o isolamento da Ricina por Hermann Sttillmark em 1888. Seus dados são referentes a experimentos realizados com extratos obtidos a partir da planta *Ricinus communis*, popularmente conhecida como mamona, onde foi observado que extratos de sementes, assim como de outros vegetais pertencentes à família Euphorbiaceae, tinham capacidade de aglutinar hemácias de diferentes animais (STILLMARK, 1888). Essa lectina é uma proteína

heterodimérica com especificidade de ligação para galactose e 2-N-acetil-galactosamina (Lord, 1994). No entanto, o interesse pelas lectinas tornou-se mais evidente na década de 60 do século XX, quando pesquisadores começaram a se interessar pelos estudos das propriedades aglutinantes e ligantes dessas proteínas. Estas propriedades tornavam as lectinas úteis como reagentes para detecção, isolamento e caracterização parcial de glicoproteínas, além de ter possibilitado o estudo das mudanças dos padrões glicídicos que podem ocorrer no glicocálice das superfícies celulares durante o desenvolvimento, diferenciação e transformação celular.

O interesse pelas lectinas continuou se intensificando nas décadas de 80 e 90, devido ao fato dessas proteínas estarem envolvidas na mediação do reconhecimento celular em muitos sistemas biológicos, tais como adesão de bactérias, vírus e protozoários em células de hospedeiros (pré-requisito para a infecção); adesão de leucócitos em células do endotélio vascular, que é um fator decisivo do trânsito dessas células nos sistemas vivos e também para sua atuação na defesa contra os patógenos (SHARON, 1993). Atualmente, o interesse pelas lectinas continua focalizado no seu papel de reconhecimento celular e sua aplicação para o estudo de carboidratos em solução e na superfície de diversos tipos de células. Trabalhos mais recentes têm estudado o envolvimento das lectinas na morte celular de diversos tipos celulares, como efeitos que interferem na proliferação celular através do potencial pró-apoptótico ou promoção de autofagia em células tumorais (ROY et al., 2014; LIU et al., 2013; SILVA et al., 2014; JACQUES et al., 2013).

Existem diferentes sistemas ou métodos pelos quais as lectinas podem ser classificadas. Comumente, são classificadas conforme similaridades em sua sequência de aminoácidos e suas estruturas terciárias. Outros critérios para classificação são dados pela sua especificidade para carboidratos, arranjo estrutural tridimensional e características topológicas tanto do sítio de reconhecimento a carboidratos quanto para a existência de diferentes sítios para outros ligantes não glicídicos em combinação (DEVARAJAN; SONAVANE, 2003). Outra classificação, proposta por Peumans e Van Damme (1995), diferencia as lectinas de acordo com seus sítios de atividade biológica e estrutura em:

a) Merolectinas: São biomoléculas que apresentam apenas um domínio de ligação de açúcar (sítio de ligação ou domínio lectínico), sendo por definição monovalentes e monoméricas. Conseqüentemente, devido ao fato de possuírem um único sítio de ligação a carboidratos não apresentam atividade hemaglutinante ou capacidade de precipitar glicoconjugados. São consideradas as mais simples, estruturalmente. Como exemplos de proteínas inclusas nessa classe podem ser citadas as lectinas de orquídea, específicas para

manose e a lectina heveína, uma proteína presente no látex da seringueira, *Hevea brasiliensis* (VAN PARIJS et al., 1991).

b) **Hololectinas:** São proteínas que apresentam dois ou mais sítios de ligação para carboidratos que sejam idênticos ou homólogos e tendem a ligar o mesmo tipo de açúcar. Hololectinas são por definição divalentes ou polivalentes (oligoméricas) e, como consequência são capazes de aglutinar células e/ou precipitar glicoconjugados. Apresentam-se, normalmente, como dímero ou tetrâmero. São as mais estudadas, pois incluem a maioria das lectinas de leguminosas, assim uma grande quantidade de lectinas presentes em plantas classifica-se como hololectinas, dentre as quais se podem citar as lectinas de *Canavalia ensiformis* (ConA), *Canavalia brasiliensis* (ConBr), *Artocarpus integrifolia* (Jacalina) e *Griffonia simplicifolia* (VAN DAMME et al., 1998; CAVADA et al., 2001).

c) **Quimerolectinas:** São fusões de proteínas tendo um ou mais sítios de ligação de açúcar, além de possuir outro sítio não lectínico com atividade biológica. Um sítio de ligação deve ser preenchido por um carboidrato com atividade biológica bem definida agindo independentemente dos outros sítios de ligação. Este grupo geralmente enquadra proteínas com dupla função, mas que são complementares entre si como, por exemplo, proteínas relacionadas com invasividade celular, as quais utilizam o domínio de reconhecimento ao açúcar como ponto para ancoragem e subsequentemente age com o outro domínio para efetivar a entrada ou até mesmo a destruição de membranas. Dependendo do número de sítios de ligação, quimerolectinas podem se comportar como merolectinas ou hololectinas. Como exemplos dessa classe citam-se as proteínas inativadoras de ribossomo tipo 2, que apresentam mais de um domínio de ligação a carboidrato, comportando-se também como hololectinas.

d) **Superlectinas:** Referem-se a proteínas que apresentam dois ou mais sítios lectínicos, assim como as hololectinas, entretanto, seu domínio catalítico pode reconhecer diferentes tipos de açúcar, apresentando especificidades a carboidratos diferentes. São menos encontradas do que as hololectinas. Exemplos são a jacalina (lectina de sementes *Artocarpus integrifolia* – MOREIRA; AINOUS, 1978) e da frutalina (lectina de sementes de *Artocarpus incisa* – MOREIRA et al., 1998), que se ligam tanto a D-galactose como a D-manose. Em algumas situações, superlectinas podem ser consideradas casos especiais de quimerolectinas.

Lectinas podem reconhecer mono-, oligo- ou polissacarídeos, bem como glicoconjugados e, assim, reconhecer glicoproteínas ou glicolipídeos, por exemplo, na superfície das células (SHARON; LIS, 1995). Cada molécula de lectina contém geralmente dois ou mais sítios de ligação a carboidratos. Assim, suas interações na superfície de membranas que expressam múltiplos carboidratos (como eritrócitos) resultam na ligação

cruzada das células e sua subsequente precipitação (UNITT; HORNIGOLD, 2011). Além do sítio ligante para o carboidrato específico, algumas lectinas também possuem um segundo tipo de sítio ligante que se interage com ligantes não glicídicos, como por exemplo, bases nitrogenadas (SINGH et al., 1999). Para ser considerada como uma lectina, uma determinada proteína ou glicoproteína deve preencher três requisitos: (i) se ligar a carboidratos; (ii) ser distinta de imunoglobulinas e (iii) não modificar bioquimicamente o carboidrato ao qual se liga (AFONSO-CARDOSO et al., 2011; RÜDIGER; GABIUS, 2001). As lectinas podem ser obtidas a partir de quase todos os organismos vivos: microorganismos, plantas e animais (SHARON; LIS, 2004; AMBROSI et al., 2005; PEUMANS et al., 2001; KILPATRICK, 2002; MISLOVICOVA et al., 2009) e são ubíquas na natureza, mas a grande maioria das lectinas isoladas e caracterizadas são de origem vegetal.

1.9. Lectinas de leguminosas

Embora sejam conhecidas aproximadamente 500 lectinas vegetais, apenas cerca de 200 estruturas tridimensionais de lectinas são conhecidas e foram depositadas em bancos de dados, sendo estas oriundas tanto de vegetais, quanto de animais, bactérias e de vírus. Destas, mais da metade das estruturas tridimensionais conhecidas são de origem vegetal, talvez por conta da facilidade de obtenção em virtude dos diferentes locais de armazenagem na planta, da abundância relativa e ainda devido à utilização de métodos relativamente simples para purificação destas (VAN DAMME et al., 2004; VAN DAMME et al., 1998; PRATAP et al., 2002). As lectinas vegetais embora possam ser encontradas em diversas partes das plantas, tais como folhas (COELHO; SILVA, 2000), cascas (INA et al., 2005), raízes (WANG; NG, 2006) e flores (SUSEELAN et al., 2002), são geralmente encontradas em maior quantidade em órgãos de estocagem, como por exemplo, em sementes (LATHA et al., 2006), sendo que a concentração presente pode variar amplamente de uma espécie para outra (RUDIGER; GABIUS, 2001). As lectinas de plantas que são produzidas em órgãos de estocagem que se encontram em sementes, na grande maioria, mas também em tubérculos, bulbos e raízes, dependendo da planta, dominam os estudos em lectinologia devido à sua elevada abundância na planta.

A maioria das lectinas costuma desempenhar funções no próprio vegetal qua a produz como, por exemplo, servir de fator de reconhecimento, participar do estoque de nitrogênio, ter função de defesa, como ainda interagir com glicoconjugados de outros organismos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). O fato das lectinas de plantas serem capazes de se ligar a glicoconjugados presentes de outros organismos, que não são comumente encontrados ou

que estão totalmente ausentes nos vegetais, é um forte indício de que elas possuem função de proteção nas plantas que as produzem. Um exemplo a ser citado é o caso das lectinas ligantes de quitina, que são capazes de interagir com este carboidrato que é tipicamente encontrado na parede celular de fungos e no exoesqueleto de invertebrados (PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

As lectinas vegetais dividem-se em sete famílias diferentes, nomeadamente, lectinas de leguminosas, lectinas de monocotiledôneas ligadoras de manose, lectinas ligadoras de quitina, lectinas RIPS tipo 2, lectinas semelhantes à jacalina, lectinas semelhantes à amarantina e lectinas de floema de curcubitácea (VAN DAMME et al., 1998). Dentre estas famílias, a que possui mais estudos em lectinologia é a Leguminosae, provavelmente devido à elevada concentração de proteínas em suas sementes, cerca de 10% do total proteico, e à relativa facilidade de obtenção (SHARON; LIS, 1990). A expressão “lectinas de leguminosas” refere-se a um grupo particular de lectinas de plantas que são encontradas exclusivamente na família das *Leguminosae*. Convém ressaltar, entretanto, que nem todas as lectinas encontradas em leguminosas pertencem ao grupo de lectinas de leguminosas, para se enquadrarem como tal é necessário que a lectina preencha determinadas características do grupo. As lectinas desse grupo normalmente possuem cerca de 220 a 250 resíduos de aminoácidos (cerca de 30 kDa) por monômero e são extremamente semelhantes quanto aos aspectos estruturais, apresentando o mesmo tipo de enovelamento em relação a seus monômeros (RICHARDSON, 1981). O grau de conservação da estrutura terciária das lectinas de leguminosas é tão bem definido que há uma classe de enovelamento própria, que recebe o nome de enovelamento das lectinas de leguminosas (MANOJ; SUGUNA, 2001).

O monômero de lectinas de leguminosas é composto por 3 folhas- β de fitas antiparalelas, interligadas por voltas e alças (*loops*), formando uma estrutura na forma achatada. As duas maiores folhas- β formam o que se chama “sanduíche”, no qual a folha maior composta por 6 fitas antiparalelas é geralmente denominada de folha- β posterior e a outra composta por 7 fitas também antiparalelas é denominada de folha- β frontal. Esta conformação em “sanduíche” se apresenta um pouco mais aberta em uma das extremidades, onde se encaixa a terceira e menor folha- β , com 5 fitas β antiparalelas, perpendicular à folha posterior e compartilhando fitas- β retorcidas com a folha- β posterior (LORIS et al., 1998; BRINDA et al., 2004) (Figura 07).

Figura 07. Representação esquemática generalizada do monômero de lectinas de leguminosas obtida do modelo estrutural do monômero da Concanavalina A.

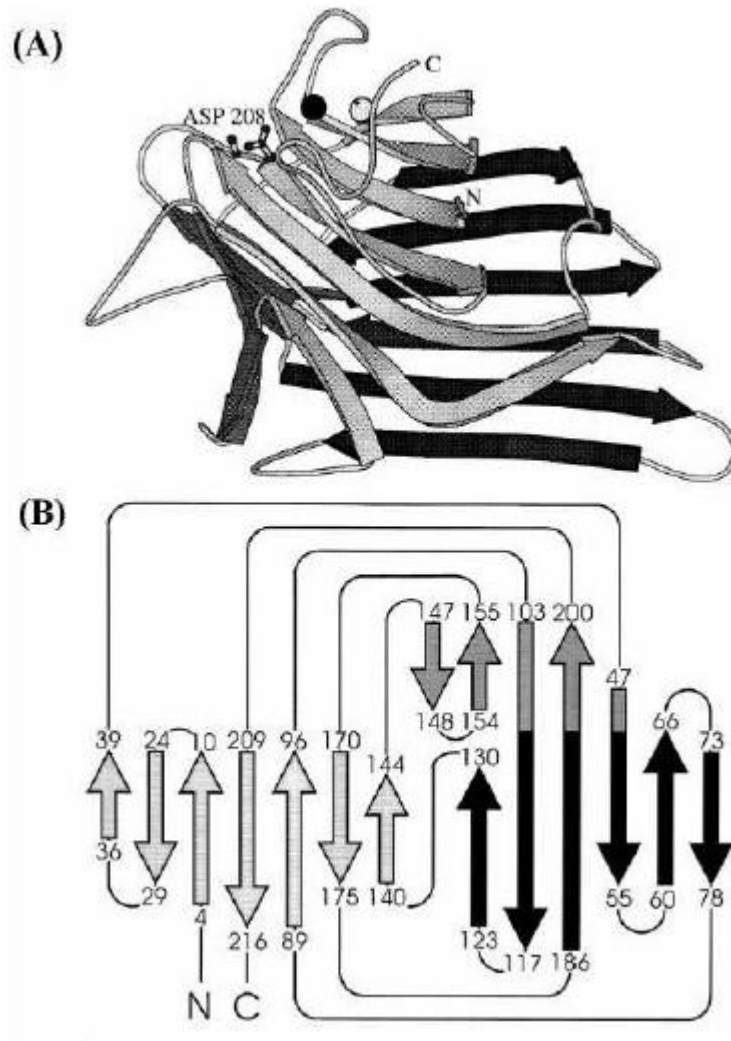


Imagem tridimensional em diagrama de Ribbon (A) com destaque para o resíduo cis-aspartato, Asp208, mostrado em diagrama bola-bastão e os íons cálcio e manganês estão representados em preto e cinza. (A) Diagrama de topologia para enovelamento. As cores são as mesmas da imagem B e representam a estrutura com 6 fitas antiparalelas das costas em preto, 7 fitas em cinza claro e 5 fitas em cinza escuro. Representação extraída e modificada a partir de LORIS et al. (1998).

Esta orientação antiparalela das fitas beta e a mudança entre uma face e outra, forma uma estrutura estável, explicando, pelo menos parcialmente, a extrema resistência de lectinas de leguminosas à ação de muitas enzimas (RICHARDSON, 1981). O principal núcleo hidrofóbico do monômero está localizado entre as folhas- β posterior e frontal. Na lectina de leguminosa, ConA, em conformação tetramérica, bem como em outras lectinas de leguminosas há água em sua cavidade central e esta região é dita ser relacionada à ligação de

vários compostos não-polares, tais como a auxina, ácido β -indolacético e ácido α -aminobutírico (ROBERTS et al., 1983; DELATORRE et al., 2007).

A estrutura globular característica, formada pelos domínios de folhas β -pregueadas dobradas sobre si mesmas, determina o sítio de ligação ao carboidrato (especificidade primária), mais especificamente, o sítio de ligação do monômero é formado pelos quatro loops localizados na parte superior da lectina. Esse sítio possui uma tríade, relativamente bem conservada, de aminoácidos dentre as lectinas de leguminosas, sendo eles ácido aspártico, asparagina e glicina, os quais discriminam os glicídeos ligantes através de ligações de hidrogênio entre suas cadeias laterais e as hidroxilas do carboidrato. Essa característica constitui, então, uma grande habilidade dessas lectinas, que é diferenciar seus ligantes por ligações de hidrogênio estabelecidas com um grupo comum de cadeias laterais de aminoácidos (SHARON, 1993).

A atividade ligante das lectinas de leguminosas depende da presença simultânea do íon cálcio e de um íon metálico de transição, geralmente manganês, coordenados próximos ao sítio de ligação ao carboidrato. Dentre os ligantes que podem coordenar esses metais, podem ser citados as cadeias laterais de ácido aspártico, inclusive aquele pertencente à tríade envolvida diretamente na ligação ao carboidrato (Figura 08). Quando em arranjo tetramétrico, as lectinas de leguminosas não apresentam simetria radial, em virtude dos posicionamentos dos monômeros serem diferentes uns dos outros. Estes em geral possuem basicamente dois planos de simetria e sendo assim ditos dímeros de dímeros (BRINDDA et al., 2004).

A existência de um grande número de lectinas com especificidades glicídicas diferentes e distintas levou à utilização dessas proteínas como ferramentas úteis na pesquisa médica e biológica. Dentre as famílias de lectinas de plantas já caracterizadas, a família lectina leguminosa é bem conhecida por suas funções de longo alcance biológico: essas proteínas versáteis são utilizadas para tipagem de grupos sanguíneos, como agentes mitogênicos (algumas lectinas, como ConA estimulam a mitose de certos tipos de linfócitos); como sondas de detecção de alterações durante o crescimento e transformação celular, podem também ser imobilizadas em matrizes inertes para produção de colunas cromatográficas de afinidade para purificação de glicoproteínas. Um grande número de lectinas com diferentes especificidades já foram conjugadas com isotiocianato de fluoresceína, um marcador fluorescente bastante utilizado na pesquisa farmacológica, e estão disponíveis comercialmente para trabalhos aplicados nos diferentes ramos de pesquisa na área biomédica (KENNEDY et al., 1995; CAVADA et al., 2001). Outras atividades incluem funções anti-tumoral, anti-fúngicas e anti-virais (CAVADA et al., 2001), efeito vasorelaxante, através da liberação de óxido nítrico

(GADELHA et al., 2005), inibição da entrada do vírus HIV por lectinas ligadoras de manose (BALZARINI et al., 2004), entre outras inúmeras atividades. Mais recentemente, as pesquisas concentraram-se sobre as lectinas que possuem atividade envolvida nos mecanismos de morte celular, com alterações na proliferação celular, através de atividades pró-apoptóticas ou indutoras de autofagia em células tumorais e até mesmo em células com ausência de tumor, porém danificadas (LI et al., 2010; ROY et al., 2014; LIU et al., 2013; SILVA et al., 2014; JACQUES et al., 2013). Dessa forma, o uso dessas moléculas *in vitro* mostra que essas proteínas são uma fundamental ferramenta no conhecimento dos mecanismos que envolvem a codificação, principalmente de característica glicídica, em biomoléculas, além do seu próprio potencial de atividades farmacológicas nos mais variados tipos celulares.

Figura 08. Representações esquemáticas da ligação de íons e carboidrato a lectinas de leguminosas.

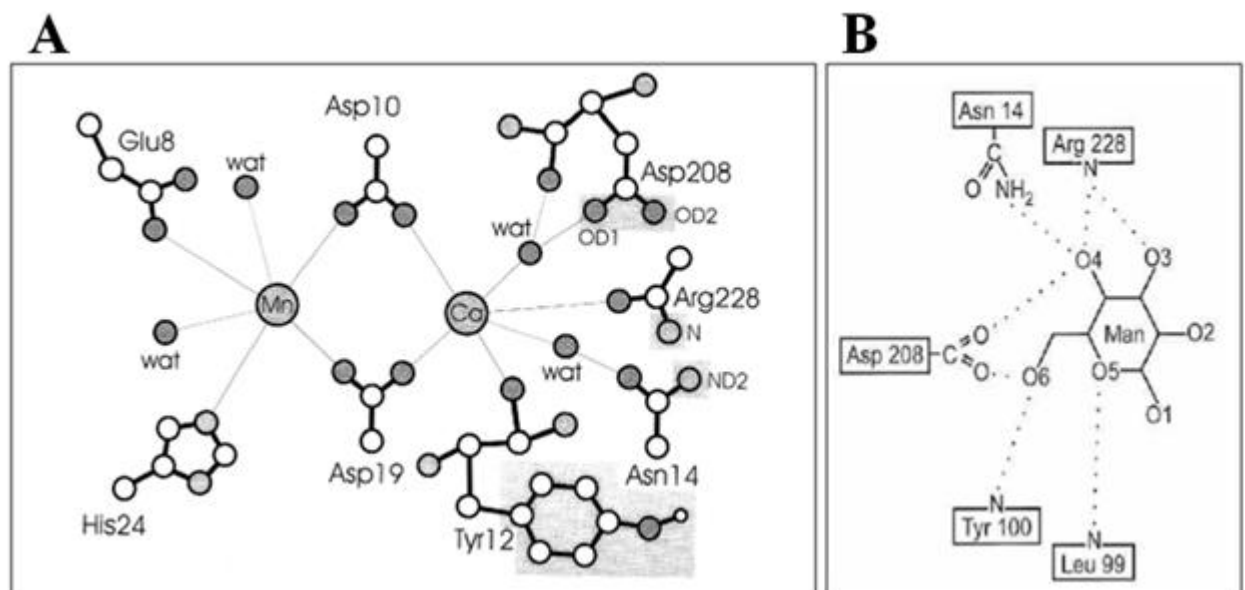


Imagem mostrando o sítio de ligação duplo da ConA (A). Os átomos de carbono estão em branco, nitrogênio em cinza claro e oxigênio em cinza escuro. Os dois íons estão indicados em cinza no centro da figura. Grupos funcionais essenciais para ligação de carboidratos estão destacados por uma caixa em cinza claro. Moléculas de água estão indicadas com wat. A figura B representa os resíduos do sítio de ligação a monossacarídeos da ConA ligados à manose (Man). Fonte: LORIS et al. (1998).

1.10. Lectina isolada de *Canavalia ensiformis* (L.) DC. (ConA)

A concanavalina A (ConA), como a lectina mais bem representativa da família de lectinas leguminosas, tem atraído crescente atenção devido à sua grande quantidade de efeitos

biológicos. A história das análises com ConA inicia-se em 1916 com o estudo do isolamento de duas globulinas de Jack bean (JONES; JOHNS, 1916), sendo isolada por Sumner (1919). ConA foi a primeira lectina leguminosa a ser purificada e cristalizada em 1936 (SUMNER; HOWELL, 1936), e posteriormente em 1972, a estrutura primária e tridimensional de ConA foi desenvolvida (WATKINS; MORGAN, 1952; EDELMAN et al., 1972; HARDMAN; AINSWORTH, 1972). O monômero de ConA é denominado motivo “jelly roll”, que é composto de duas folhas- β antiparalelas, sendo uma folha- β frontal curva, composta de sete fitas e uma folha- β plana posterior, composta de seis fitas, havendo ainda uma terceira folha- β composta de 5 fitas, que é considerada por fazer a conexão da parte frontal com a parte posterior (VAN DAMME et al., 1998). A maioria das lectinas de leguminosas compartilham estrutura de monômero semelhante a ConA.

O dímero de ConA envolve o alinhamento de duas folhas posteriores em uma maneira paralela e antiparalela (LORIS et al., 1998). Dois dímeros paralelos de ConA são conectados aos posteriores e formam o tetrâmero de ConA (Figura 09) (SINHA et al., 2007). Esta lectina de leguminosa apresenta-se como um tetrâmero em pH acima de 5,5 ou neutro; e como dímero em pH abaixo de 5,5 (AGRAWAL; GOLDSTEIN, 1965). Cada tetrâmero tem massa molecular igual a 102.332 unidades de massa atômica (u.m.a) com 948 resíduos de aminoácidos, dentre os quais, 148 possuem cadeias laterais terminadas em grupamentos aminas ou amidas e 100 contêm cadeias laterais terminadas em grupamentos carboxílicos (SANZ-APARICIO et al., 1997; NEUMANN et al., 2004).

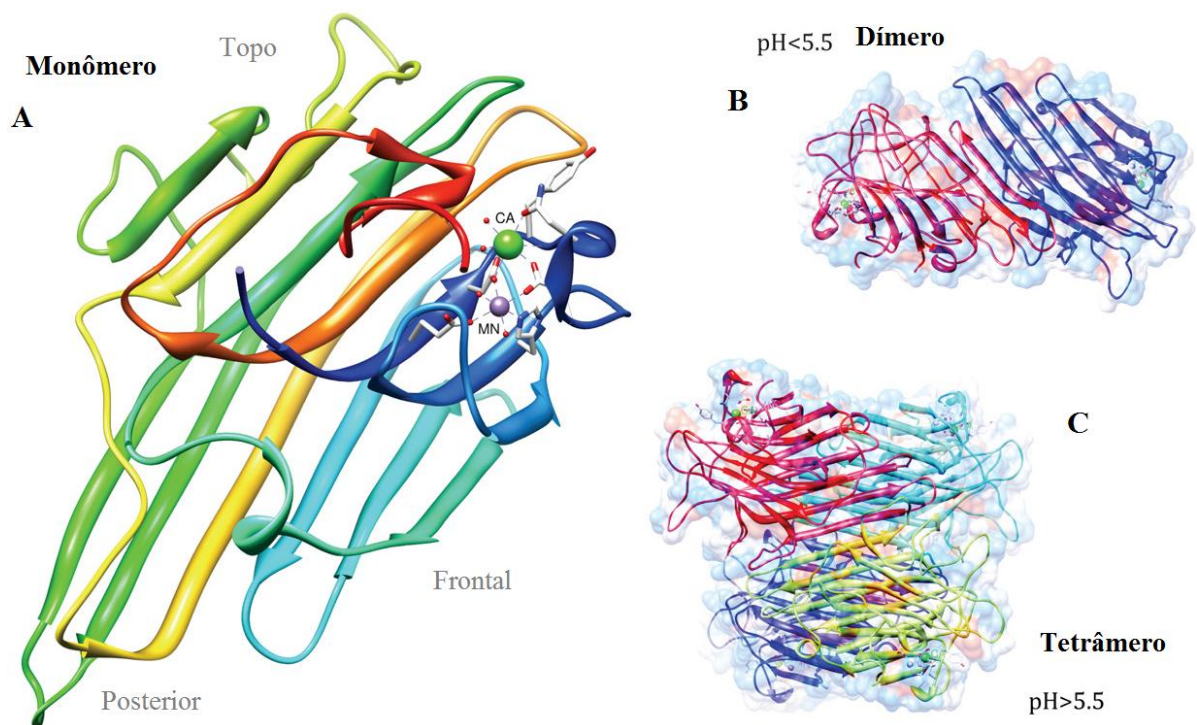
Uma pesquisa com ConA realizada em 1936 demonstrou, pela primeira vez, que as lectinas eram proteínas ligantes de carboidrato (SUMNER; HOWELL, 1936), e posteriormente mostrou-se específica para os açúcares glicose e manose, bem como para o açúcar alfa-metil-manosídeo (GOLDSTEIN, 1975). Além disso, a concanavalina A foi a primeira lectina de leguminosa a ser descrita como possuidora de sítios de ligação a metal (considerada então, uma metaloproteína) (HARDMAN; AGARWAL; FREISER, 1982), uma vez que a cada um de seus monômeros estão complexados um átomo de Ca^{2+} e um átomo de metal de transição (geralmente Mn^{2+}), sendo posteriormente descoberto que o complexo desses dois íons atua estabilizando o sítio de ligação ao carboidrato (NEUMANN et al., 2004; BOTOS; WLODAWER, 2005). Até 1985 a clonagem molecular e biossíntese de ConA foi realizada (CARRINGTON; AUFFRET; HANKE, 1985).

Em vista disso, ConA é a lectina vegetal mais bem estudada. Tem sido caracterizada quanto a sua estrutura e efeitos biológicos sobre células de mamíferos. A ConA é uma lectina D-glicose/D-manose específica e seu monômero contém 237 resíduos de aminoácidos e tem a

capacidade de precipitar polissacarídeos complexos (CAVADA et al., 2001). Visto que a glicose e manose são frequentemente encontradas em glicoconjugados de membrana de um grande número de células, a Con A pode se ligar a muitos tipos diferentes de células de uma ampla gama de organismos (ZHAO et al., 2002).

A fácil preparação da ConA e o grande número de sacarídeos com os quais ela pode interagir, levaram a numerosos estudos com esta lectina (AMBROSI et al., 2005). As aplicações da Con A incluem a marcação de estruturas de membrana de células normais e tumorais, o estudo de glicosilação em células transformadas, e o fracionamento de preparações de polissacarídeos, glicoproteínas e glicopeptídeos em colunas de afinidade a ConA (CHATTERJEE; MANDAL, 2005). Essa lectina também é um mitógeno de linfócitos, induzindo a proliferação de linfócitos T (JAIN et al., 2000).

Figura 09. Estruturas moleculares de monômero de ConA (A), dímero de ConA (B) e tetrâmero de ConA (C).



Fonte: LI et al. (2011)

A concanavalina A é uma lectina extraída das sementes da planta leguminosa *Canavalia ensiformis* (L.) DC. (Jack bean) (família Leguminosae, tribo Phaseoleae, subtribo Diocleinae), popularmente conhecida como feijão-de-porco ou feijão espada (Figura 10), que se enquadra dentro do grupo das hololectinas. Foi a primeira lectina a ser isolada, sequenciada e a ter sua

estrutura tridimensional determinada por cristalografia de raio-X . Os estudos bioquímicos, biofísicos e estruturais realizados com ConA tornam esta proteína a lectina melhor caracterizada até o momento (CAVADA et al., 2001).

Em vista disso, ConA é a lectina vegetal mais bem estudada. Tem sido caracterizada quanto à sua estrutura e efeitos biológicos sobre células de mamíferos. A ConA é uma lectina D-glicose/D-manose específica e seu monômero contém 237 resíduos de aminoácidos e tem a capacidade de precipitar polissacarídeos complexos (CAVADA et al., 2001). Visto que a glicose e manose são frequentemente encontradas em glicoconjugados de membrana de um grande número de células, a Con A pode se ligar a muitos tipos diferentes de células de uma ampla gama de organismos (ZHAO et al., 2002).

A fácil preparação da ConA e o grande número de sacarídeos com os quais ela pode interagir, levaram a numerosos estudos com esta lectina (AMBROSI et al., 2005). As aplicações da Con A incluem a marcação de estruturas de membrana de células normais e tumorais, o estudo de glicosilação em células transformadas, e o fracionamento de preparações de polissacarídeos, glicoproteínas e glicopeptídeos em colunas de afinidade a ConA (CHATTERJEE; MANDAL, 2005). Essa lectina também é um mitógeno de linfócitos, induzindo a proliferação de linfócitos T (JAIN et al., 2000).

Figura 10. Leguminosa *Canavalia ensiformis* (L.) DC. (Jack bean) (feijão espada).



Mais recentemente, as pesquisas concentraram-se sobre seu papel na morte celular, bem como seu potencial pró-apoptótico e anti-proliferativo em células tumorais, investigando os mecanismos na indução de apoptose e autofagia em uma variedade de células (LI et al., 2011; ROY et al., 2014). Foi demonstrado que ConA induz morte celular programada, seguindo as

vias de apoptose e autofagia, mediadas pela mitocôndria, além de exibir efeitos de anti-angiogênese (LI et al., 2011). Alguns experimentos confirmaram a participação de ConA nas vias de morte celular de diversos tipos de células, incluindo células PU-1.8, células humanas de melanoma A375 e células humanas de carcinoma de fígado hepatocelular HepG2 (LI et al., 2010; LIU et al., 2009; LIU; BIAN; BAO, 2010). Em todos esses estudos ConA promoveu morte celular por via apoptótica, com grande participação da via intrínseca nesse processo. Contudo não há nenhum estudo relacionando ConA com efeito anti-necrótico em nenhum tipo de célula, e também não foram encontrados trabalhos mencionando a relação de ConA com o metabolismo mitocondrial na morte celular por necrose.

A partir da purificação da ConA, várias outras lectinas com propriedades físicas semelhantes têm sido isoladas de outras espécies da subtribo Diocleinae, como por exemplo a lectina ConBr (MOREIRA; CAVADA, 1984) que tem sido extensivamente estudada atualmente devido às suas propriedades envolvidas nos padrões de morte celular. Lectinas que fazem parte dessa subtribo partilham muitas características, todas são específicas de glicose/manose e possuem estruturas quaternárias semelhantes. Embora tenham similaridade estrutural e de afinidade por determinados carboidratos, as lectinas desta subtribo podem apresentar efeitos biológicos distintos (CAVADA et al., 2001).

1.11. Lectina isolada de *Canavalia brasiliensis* MART (ConBr)

A leguminosa *Canavalia brasiliensis* MART. é uma trepadeira pertencente à família Fabaceae, cujos exemplares podem atingir de 0,5 m a 5 m, dependendo do porte (arbustivo ou arbóreo) da espécie suporte. Apresenta raízes amarelas, folhas alternadas, trifolioladas, com as flores apresentando coloração roxa e as pétalas reunidas em inflorescências do tipo paniculada, com escapo floral de coloração verde-arrocheada (Figura 11). Trata-se de uma planta nativa do novo mundo, com distribuição geográfica natural ampla, sendo encontrada no México, Caribe, Paraguai, Argentina e também no nordeste e sul do Brasil (SAUER, 1964).

Esta angiosperma é popularmente conhecida como feijão-de-porco, feijão bravo ou feijão bravo do Ceará (GUEDES et al., 2009). A *Canavalia brasiliensis* é uma planta de fácil cultivo, sendo relativamente tolerante à seca. No cerrado brasileiro, por exemplo, pode ser cultivada como adubo verde durante a estação seca, pois sobrevive ao período de estiagem; e na época de condições climáticas mais favoráveis torna-se bastante produtiva, crescendo rapidamente durante o início da estação chuvosa (BURLE et al., 1999). Esta espécie pode ajudar na melhoria da estrutura de solos, pois apresenta um conjunto de raízes amplo e profundo, dessa forma, pode contribuir para a estabilização de terrenos propícios à erosão,

além de ser importante na ciclagem de nutrientes do solo, sendo, assim, muito utilizada como adubo, no controle da desertificação e da erosão (CARVALHO; SODRE FILHO, 2000; COBO et al., 2002).

Figura 11. Leguminosa *Canavalia brasiliensis* MART (feijão bravo do Ceará).



Fonte: Adaptado de PIRES, 2008.

A lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis*, compartilha muitas semelhanças com a lectina ConA, ambas pertencentes à família Leguminosae, tribo Phaseolae, subtribo Diocleinae, além de ConBr também se enquadrar dentro do grupo das hololectinas. ConBr tem sua estrutura cristalográfica definida, apresentando 99% da sequência de aminoácidos idêntica à da ConA e a mesma especificidade por glicose/manose (SANZ-APARICIO et al., 1997) (Figuras 12 e 13). A estrutura cristalográfica de ConBr é representada abaixo (Figura 14) e mostra os resíduos de aminoácidos que variam em relação à ConA. Apenas dois resíduos de aminoácidos são substituídos e nenhum destes resíduos está próximo do sítio de ligação de carboidratos das lectinas (SANZ-APARICIO et al., 1997; GRANGEIRO et al., 1997). Tem sido sugerido que substituições de aminoácidos fora do sítio de união de carboidratos podem ser responsáveis pela diferença na afinidade de ligação aos açúcares ou de atividades biológicas das lectinas Diocleinae (SANZ-APARICIO et al., 1997; GRANGEIRO et al., 1997).

Figura 12. Sequência de aminoácidos da ConA (NAISHMITH; FIELD, 1996) e da ConBr (GRANGEIRO et al., 1997).

```

ConA      1                               45
ConA      ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNG
ConBr     ADTIVAVELDTYPNTDIGDPSYPHIGIDIKSVRSKKTAKWNMQNG

ConA      46                               90
ConA      KVGTAHIIYNSVDKRLSAVVSYPNADSATVSYDVDLDNVLPEWVR
ConBr     KVGTAHIIYNSVGKRLSAVVSYPNGDSATVSYDVDLDNVLPEWVR
                *                *

ConA      91                               135
ConA      VGLSASTGLYKETNTILSWSFTSKLKSNSTHETNALHFMFNQFSK
ConBr     VGLSASTGLYKETNTILSWSFTSKLKSNSTHETNALHFMFNQFSK

ConA      136                               180
ConA      DQKDLILQGDATTGTDGNLELTRVSSNGSPQGSSVGRALFYAPVH
ConBr     DQKDLILQGDATTGTEGNLRLTRVSSNGSPQGSSVGRALFYAPVH
                *      *

ConA      181                               225
ConA      IWESSAVVASFEATFTFLIKSPDHPADGIAFFISNIDSSIPSGS
ConBr     IWESSAVVASFEATFTFLIKSPDHPADGIAFFISNIDSSIPSGS

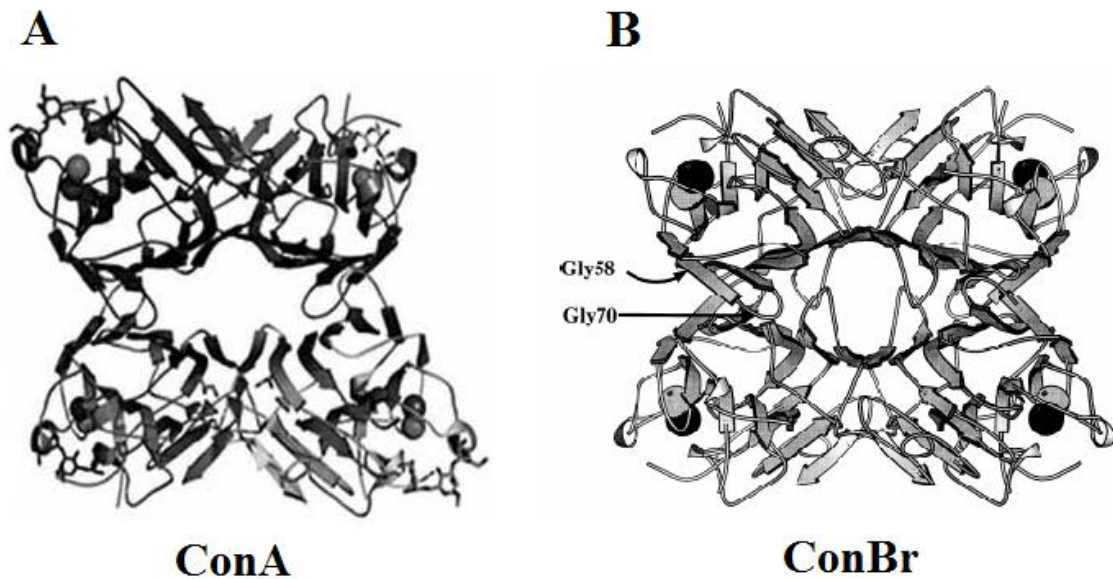
ConA      226      237
ConA      TGRLLGLFPDAN
ConBr     TGRLLGLFPDAN

```

O asterisco (*) indica as diferenças na sequências de aminoácidos das lectinas. Fonte: Adaptado de BARBOSA et al. (2001).

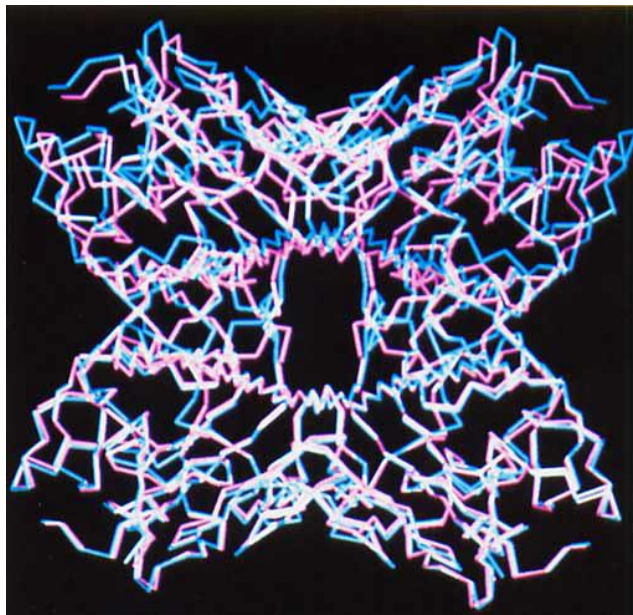
Devido às propriedades biológicas e estruturais conhecidas da ConBr, diversos estudos têm sido realizados com essa lectina. Os efeitos biológicos da ConBr incluem estimulação da produção de óxido nítrico por macrófagos, tanto *in vitro* como *in vivo* (ANDRADE et al., 1999; BEZERRA et al., 2011), a estimulação da liberação de histamina em mastócitos (GOMES et al., 1994; LOPES et al., 2005), indução de apoptose e dano ao DNA em células MCF-7 (FAHEINA-MARTINS et al., 2011), capacidade de estimular a proliferação de linfócitos e produção de interferon γ (BARRAL-NETTO et al., 1992), estimulação da produção de macrófagos em camundongos C3H/HeJ (RODRIGUEZ et al., 1992), ativação *in vivo* de linfócitos T e indução da apoptose celular (BARBOSA et al., 2001), atividade cicatrizante (SILVA et al., 2009), inseticida (FREITAS et al., 2011), antibacteriana (CAVALCANTE et al., 2011) e efeito neuroprotetor (RUSSI et al., 2012).

Figura 13. Estrutura global dos tetrâmeros de ConA e ConBr e a localização das quatro subunidades.



As posições dos resíduos de Gly 58 e Gly 70 em ConBr (figura B) são substituídas por Asp e Ala em ConA (figura A), respectivamente. As esferas cinza e preta representam os íons de transição, Mn^{2+} e Ca^{2+} , respectivamente (Adaptado de SANZ-APARICIO et al., 1997; LI et al., 2010).

Figura 14. Comparação (por superposição) das estruturas tridimensionais dos tetrâmeros de ConA (magenta) e ConBr (azul e branco).



Fonte: Adaptado de GRANGEIRO et al. (1997).

Atualmente, muitos trabalhos têm dado especial atenção às propriedades de ConBr no envolvimento da morte celular em uma diversidade de tecidos. Um estudo com células de

melanoma murino B16F10 mostrou que ConBr reduz a viabilidade das células tumorais através da promoção de apoptose, observando também diminuição da migração celular (SILVA et al., 2014). Outro trabalho mostrou que ConBr apresenta um efeito neuroprotetor contra a neurotoxicidade causada por glutamato, sendo este efeito dependente da via PI3K/Akt, que é uma via intrinsecamente relacionada à morte celular por apoptose ou autofagia (JACQUES et al., 2013). As lectinas de *Canavalia ensiformis* e *Canavalia brasiliensis* foram também avaliadas conjuntamente na atividade antiproliferativa em linhagens de células leucêmicas. Os resultados encontrados mostraram que ambas as lectinas inibem a proliferação das células tumorais através da promoção de apoptose, melhorando a estabilidade mitocondrial (FAHEINA-MARTINS et al., 2012). Contudo, em nenhum desses trabalhos foi avaliado a relação do domínio lectínico de ConA ou ConBr no envolvimento de alterações nos padrões de morte celular, bem como em nenhum estudo celular com ConA ou ConBr foram encontrados análises dos seus potenciais antinecróticos.

2. JUSTIFICATIVA

Devido à grande diversidade de atividades biológicas já descobertas das lectinas ConA e ConBr, e suas propriedades amplamente conhecidas de efeitos antiproliferativos em diversos tipos de células, o estudo com essas duas lectinas nos fenômenos de morte celular tem se intensificado nos últimos anos (SILVA et al., 2014; JACQUES et al., 2013), com alguns desses trabalhos sugerindo que o equilíbrio do potencial de membrana mitocondrial está envolvido como sendo, pelo menos, uma das vias de participação da atividade biológica de ConA e ConBr nesses eventos estudados (LI et al., 2010; LIU et al., 2009; LIU; BIAN; BAO, 2010; ROY et al., 2014; LI et al., 2011; FAHEINA-MARTINS et al., 2012). Contudo em nenhum trabalho realizado com ConA ou ConBr foi investigado o papel dessas lectinas como biomoléculas potenciais para evitar o curso da morte celular por necrose e suas consequências inflamatórias em modelos de lesão tecidual.

A pancreatite aguda é uma enfermidade, ainda de cura desconhecida, que quando cursada para a sua forma grave acarreta morte em cerca de 20-30% dos casos (BEGER; RAU, 2007), nesse contexto, inúmeros estudos com células acinares pancreáticas de humanos ou murinos têm mostrado que a fisiopatologia da pancreatite aguda está intrinsecamente relacionada com eventos que acontecem dentro da célula acinar, que levam a alterações de função mitocondrial, com subsequente diminuição de ATP, e finalmente necrose celular (CRIDDLE et al., 2006; BOOTH et al., 2011).

Sendo ConA e ConBr lectinas homólogas, com apenas uma discreta mudança nas suas sequências de aminoácidos, e ainda tendo em vista que em alguns trabalhos ambas têm mostrado participação nos processos de morte celular, envolvendo alterações do metabolismo mitocondrial, fator que está intrinsecamente relacionado com o curso da lesão celular na pancreatite aguda, e na ausência de estudos com essas lectinas em modelos de morte celular necrótica, resolvemos estudar seus efeitos nos três principais modelos de lesão em células acinares pancreáticas, a fim de observar a participação dessas proteínas nesse fenômeno e ainda se ambas comportam-se de maneira semelhante. Com isso, este trabalho propõe buscar alvos terapêuticos, a partir de produtos naturais, que evitem a morte necrótica das células acinares pancreáticas e os seus consequentes danos inflamatórios, levando, dessa forma, a uma possível melhora do quadro da pancreatite aguda.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos das lectinas ConA e ConBr em células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por ácido taurolitocólico sulfatado (SATC), etanol ou ácido palmitoleico (APO), bem como o envolvimento da morte celular em tal processo.

3.2. Objetivos específicos

- Estudar o efeito de ConA e ConBr na necrose induzida por ácido taurolitocólico sulfatado (SATC), etanol ou ácido palmitoleico (APO) em células acinares pancreáticas;
- Avaliar a participação do domínio lectínico nos efeitos de ConA e ConBr, através da:
 - ✓ Análise do papel do açúcar ligante (alfa-metil-manosídeo) no efeito de ConA e ConBr em células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por ácido taurolitocólico sulfatado (SATC), etanol ou ácido palmitoleico (APO).
 - ✓ Análise do papel do açúcar não ligante (galactose) no efeito de ConA e ConBr em células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por ácido taurolitocólico sulfatado (SATC), etanol ou ácido palmitoleico (APO).
- Observar a interação de ConA e ConBr conjugadas ao FITC com as células acinares pancreáticas.
- Estudar o papel de ConA e ConBr no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por ácido taurolitocólico sulfatado (SATC), etanol ou ácido palmitoleico (APO).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Aspectos éticos

Todos os procedimentos envolvendo animais estavam de acordo com as diretrizes apresentadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e o referido projeto recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará, sob número de protocolo 99/2013.

4.2. Animais

Foram utilizados camundongos machos da espécie *Mus musculus*, linhagem Swiss, com idade variando entre 8 a 12 semanas de idade, pesando em média 25g. Os animais foram provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. Os animais foram acomodados em gaiolas de polipropileno, medindo 40 centímetros (cm) de comprimento, 31 cm de largura e 17 cm de altura, permanecendo em um ambiente com temperatura e luminosidade controladas, mantidos em estante com variação térmica de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com exaustão de ar e respeitando o ciclo claro/escuro de 12h, com livre acesso à comida e água. A técnica de deslocamento cervical foi utilizada para eutanásia dos animais.

4.3. Lectinas vegetais

As lectinas utilizadas foram extraídas das sementes das plantas leguminosas *Canavalia ensiformis* (L.) DC. (Jack bean) (ConA) e *Canavalia brasiliensis* MART (ConBr), ambas apresentam especificidade de ligação a resíduos de D-glicose e D-manose. ConA e ConBr foram isoladas e purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex- G50 (MOREIRA; CAVADA,1984) no Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMoLab) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC). Após a purificação, as lectinas foram dialisadas em água destilada e em seguida liofilizadas. Ambas foram dissolvidas em solução de NaCl 0,9% (salina), imediatamente antes de sua utilização. ConA e ConBr conjugadas ao marcador fluorescente isotiocianato de fluoresceína (FITC) foram preparadas e cedidas pelo mesmo laboratório citado.

4.4. Aparelhos e instrumentos laboratoriais

- ✓ Agitador Vortex – Cetomart MV
- ✓ Balança Analítica Ohaus AS2600
- ✓ Centrífuga Refrigerada Eppendorf 5804R
- ✓ Contador Automático de Células – Colter
- ✓ Freezer -80°C, Thermo Scientific
- ✓ Material Cirúrgico
- ✓ Medidor de pH, Hanna Instruments HI 8519N
- ✓ Microscópio Óptico binocular Nikon Alphaphot 2 VS2
- ✓ Microscópio Confocal FluoView™ 1000 – Olympus
- ✓ Micropipetas Gilson de 2, 20, 200 e 1000 µL
- ✓ Microtubos Eppendorf
- ✓ Pipetas Pasteur
- ✓ Placas de Petri
- ✓ Provetas Volumétricas 50 mL
- ✓ Tubos de Falcon 15 e 50 mL

4.5. Fármacos, soluções e marcadores fluorescentes

Entre parênteses, estão identificadas as empresas comerciais de fornecimento de cada produto utilizado.

4.5.1. Fármacos e Reagentes

- ✓ Ácido Palmitoleico – APO (Sigma)
- ✓ Sal Dissódico de Ácido Taurolitocólico 3-Sulfato – Ácido Taurolitocólico Sulfatado – SATC (Sigma)
- ✓ Etanol Absoluto (Sigma)
- ✓ α -Metil-Manosídeo (Sigma)
- ✓ D-galactose (Sigma)

4.5.2. Soluções

- ✓ Água Destilada
- ✓ Álcool 70% (Dinâmica)
- ✓ Dimetil Sulfóxido – DMSO (Molecular Probes)

- ✓ Solução Salina Estéril – NaCl 0,9% (Isofarma)
- ✓ NaCl – 140 mmol/l (Vetec)
- ✓ KCl – 4,7 mmol/l (Dinâmica)
- ✓ MgCl₂ – 1,13 mmol/l (Vetec)
- ✓ CaCl₂ – 1 mmol/l (Vetec)
- ✓ D-glucose – 10 mmol/l (Vetec)
- ✓ HEPES (4 (2-hidroxietil) -1-piperazinoetanosulfônico ácido) – 10 mmol/l (Sigma)
- ✓ NaOH (Dinâmica)
- ✓ Colagenase Purificada CLSPA (Worthington Biochemical Corporation)

4.5.3. Marcadores Fluorescentes

- ✓ Iodeto de Propídeo (Sigma)
- ✓ Hoechst 33342 (Invitrogen)
- ✓ Tetrametil Rodamina Metil Ester – TMRM (Molecular Probes)
- ✓ Fluo-4, AM (Invitrogen)

4.6. Preparação celular e soluções

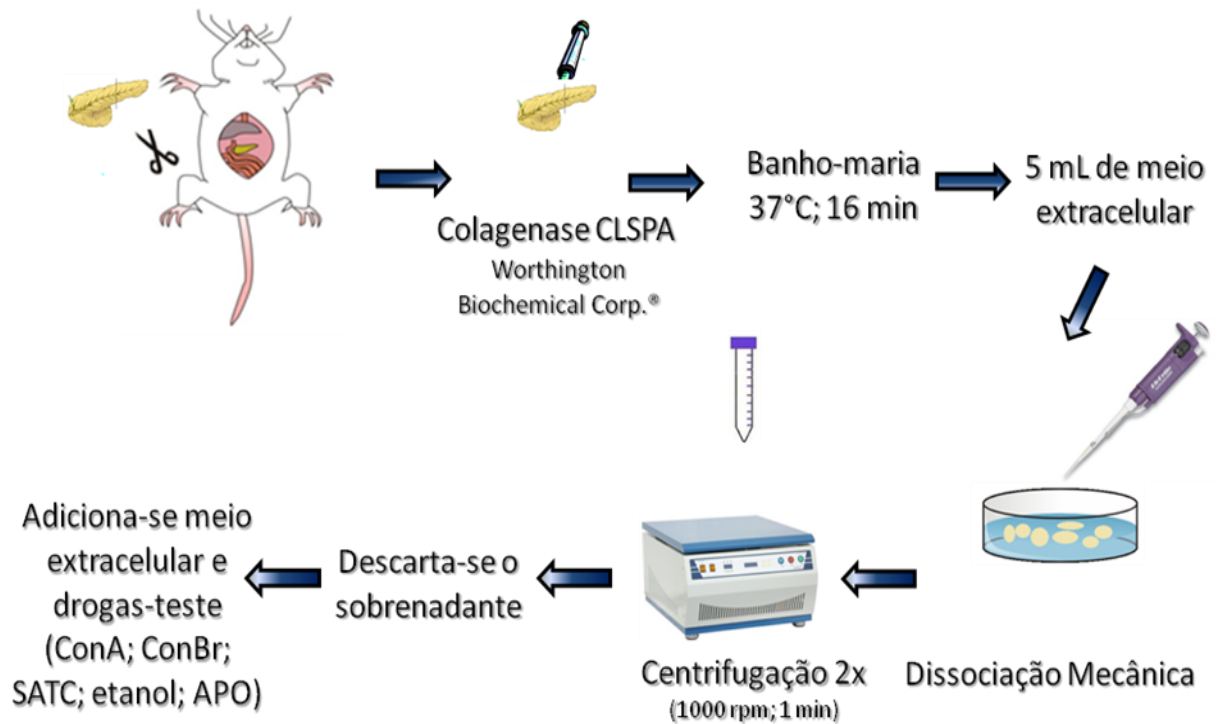
As células acinares pancreáticas foram isoladas com colagenase purificada CLSPA (Worthington Biochemical Corp.®) do pâncreas de camundongos Swiss (8-12 semanas de idade). Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente (23-25° C) e as células foram utilizadas dentro de 4 horas após o isolamento. A solução extracelular continha (em mmol/l): 140 NaCl; 4,7 KCl; 1,13 MgCl₂; 1 CaCl₂; 10 D-glucose; e 10 HEPES (4 (2-hidroxietil) -1-piperazinoetanosulfônico ácido), ajustados para pH 7,35 ± 1,0.

4.7. Isolamento das células acinares pancreáticas

Após eutanásia dos animais, o pâncreas foi removido, sendo posteriormente lavado com meio extracelular contendo Ca²⁺, a fim de eliminar resquícios de sangue ou qualquer sujidade contida no tecido. Para a digestão enzimática, foi injetado em cada pâncreas 1 ml de colagenase purificada CLSPA (200 U/ml), com posterior incubação em banho-maria a 37°C durante 16 minutos (MURPHY et al., 2008). Após a retirada do banho-maria foram acrescentados 5 ml de meio extracelular contendo Ca²⁺, e realizada a digestão mecânica com pipetagens do tecido, com o objetivo de gerar forças de cisalhamento através da passagem do pâncreas pelo orifício das ponteiras, promovendo, dessa forma, a desintegração do tecido. A

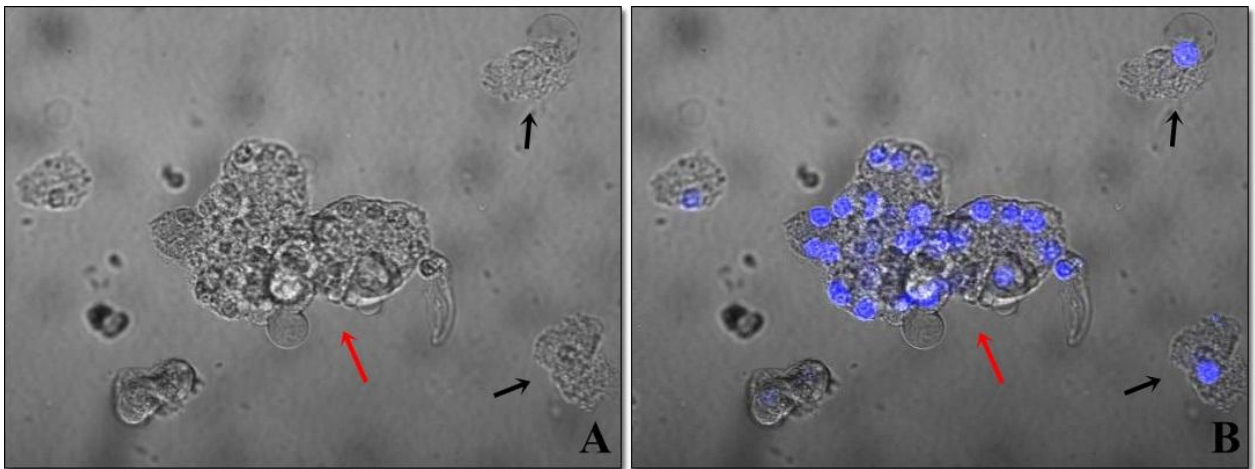
cada ciclo de 5 a 6 pipetagens, esperava-se a precipitação dos pedaços maiores de tecido e coletava-se o sobrenadante. Em seguida, ao restante de tecido que ficava no fundo do tubo de polipropileno (falcon) acrescentavam-se mais 5 ml de meio extracelular contendo Ca^{2+} , e continuavam-se os movimentos com a pipeta para desintegração do tecido. Esse processo era repetido 3 vezes para cada órgão, a fim de serem coletados, ao final, 15 ml de sobrenadante, sendo posteriormente centrifugado a uma velocidade de 1000 rpm, durante 1 minuto (min). Após a centrifugação, descartava-se o sobrenadante e as células eram ressuspensas em 5 ml de meio extracelular contendo Ca^{2+} e dava-se seguimento à segunda centrifugação com a mesma rotação e tempo da anterior. Ao final desta última, foi realizado novamente o descarte do sobrenadante e o pellet de células foi ressuspendido em 2 ou 3 ml de meio extracelular sem Ca^{2+} . Em seguida, procedeu-se a distribuição deste meio contendo as células, colocando-se 1 ml em microtubos Eppendorfs âmbar e então realizados os tratamentos adequados e incubados sob agitação com tempo determinado de acordo com cada protocolo (Figura 15). A figura 16 ilustra a imagem de um ácino isolado e de células acinares pancreáticas obtidos ao final deste processo.

Figura 15. Esquema ilustrativo da técnica de isolamento primário.



(CRIDDLE et al., 2006)

Figura 16. Imagem obtida após técnica de isolamento primário das células acinares pancreáticas.



Células visualizadas imediatamente após o isolamento, sem tratamento. O painel A mostra a imagem com a luz transmitida, sem emissão de laser, evidenciando a estrutura do ácino isolado (setas vermelhas), com células acinares isoladas ao redor (setas pretas). O painel B ilustra a mesma imagem com a emissão do laser para a marcação do fluoróforo Hoechst 33342, onde mostra a marcação dos núcleos das células. Imagens obtidas em microscópio confocal FluoViewTM 1000 – Olympus, aumento de 400X.

4.8. Análise dos efeitos de ConA e ConBr sobre a lesão celular induzida por ácido taurolitocólico sulfatado, etanol ou ácido palmitoleico

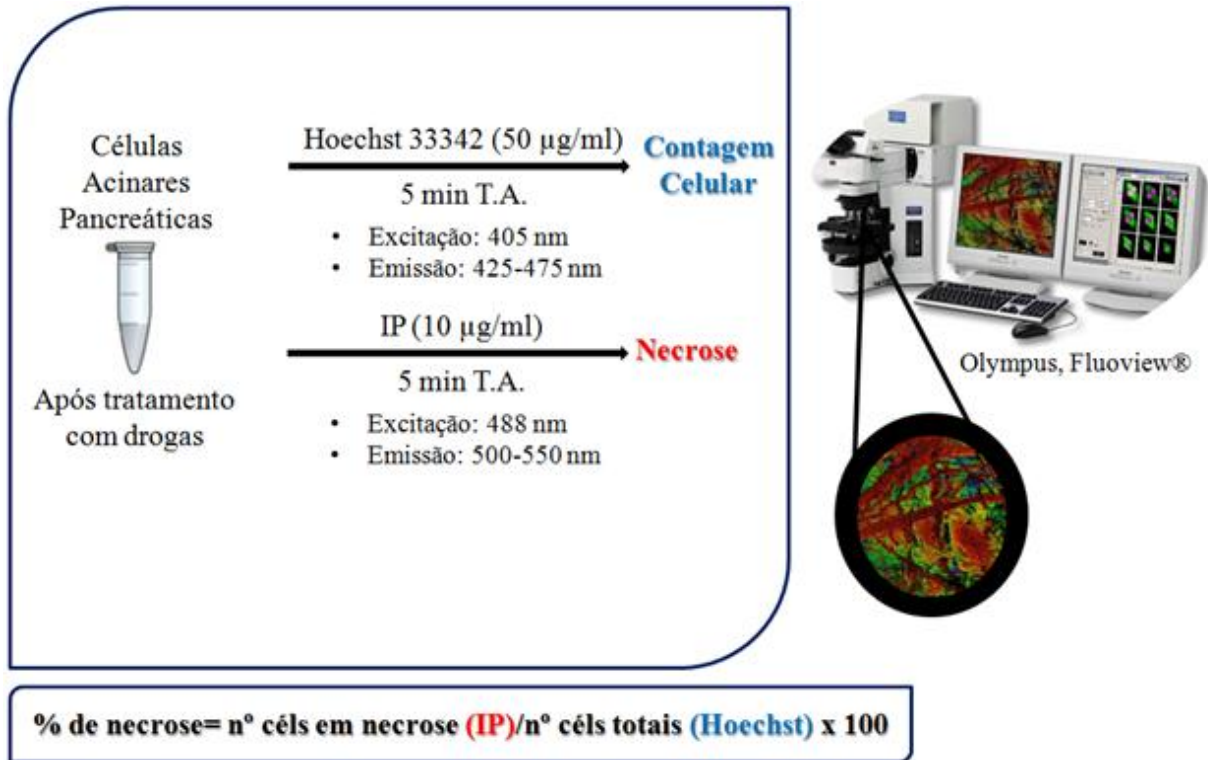
Para avaliar os efeitos de ConA (200 µg/ml) e ConBr (200 µg/ml) sobre a lesão celular induzida por ácido taurolitocólico sulfatado (SATC; 500 µM), etanol (850 mM) ou ácido palmitoleico (APO; 100 µM), as células isoladas foram previamente tratadas e incubadas com ConA ou ConBr durante 1h, seguido da administração de SATC, etanol ou APO durante 30 minutos. No grupo controle negativo para lesão celular foi administrado apenas salina; no grupo controle positivo foi avaliado o potencial necrosante dos agentes lesivos SATC, etanol ou APO durante 30 min, sem pré-tratamento com as lectinas. Em outro grupo, também utilizado como controle, foi administrado ConA e ConBr às células, com incubação durante 1h, sem a administração posterior de SATC, etanol ou APO, com a finalidade de observar a possibilidade das lectinas causarem alguma lesão às células acinares pancreáticas. A divisão e tratamento dos grupos experimentais dessa análise são representados na tabela 1.

Tabela 1. Avaliação do efeito de ConA (200 µg/ml) e ConBr (200 µg/ml) nas células acinares pancreáticas sob administração de SATC, etanol ou APO

Grupos	Administração	Tempo de Incubação	2ª Administração (Se houver)	Tempo de Incubação
I	Controle salina	1h	-	-
II	SATC ou Etanol ou APO	30 min	-	-
III	ConA	1h	-	-
IV	ConBr	1h	-	-
V	ConA	1h	SATC ou Etanol ou APO	30 min
VI	ConBr	1h	SATC ou Etanol ou APO	30 min

Após a finalização dos tratamentos, todos os grupos foram incubados por 5 minutos com o marcador nuclear Hoechst 33342 (50 µg/ml) e com iodeto de propídeo (IP; 10 µg/ml) (utilizado para detectar a ruptura da membrana plasmática, característica de necrose) (CRIDDLE et al., 2006) (Figura 17). Ao final deste processo, as células foram centrifugadas (1000 rpm, 1 min), lavadas e ressuspensas em tampão livre de Ca^{2+} para posterior visualização no microscópio confocal FluoView™ 1000 – Olympus. A fluorescência de Hoechst 33342 (excitação/emissão: 488/560-660 nm) e IP (excitação/emissão: 405/425-475) foram obtidas utilizando a objetiva de 40x. De cada grupo foram feitas 15 imagens de campos de visualização diferentes, com repetição em triplicata de cada experimento. O percentual de necrose é dado a partir da correlação do número de células totais presentes no campo de visualização, marcadas com hoechst, com o número de células em necrose, marcadas com iodeto de propídeo.

Figura 17. Quantificação de Necrose.



4.9. Avaliação da participação do domínio lectínico nos efeitos de ConA e ConBr

Neste protocolo experimental, ConA e ConBr (200 µg/ml) foram previamente incubadas durante 1h a 37°C, em banho-maria, com seu açúcar ligante α -metil-manosídeo (α -MM), na concentração de 0,2 M. Esse procedimento garante a ocupação do domínio lectínico pelo seu açúcar conjugado (ASSREUY et al., 2009). Ao fim desse processo, as lectinas ligadas ao α -MM foram administradas nas células e incubadas durante 1h, seguida da administração e incubação durante 30 minutos com os agentes lesivos SATC, etanol e APO. Com o intuito de eliminar o viés da possibilidade do açúcar α -MM estar causando alguma alteração celular, um grupo de células recebeu administração de α -MM sozinho, sem ligação com as lectinas, durante 1h. A tabela 2 descreve a divisão e tratamento dos grupos experimentais deste protocolo. Seguindo o mesmo procedimento de incubação em banho maria, durante 1h a 37°C, em outra análise, as lectinas foram previamente incubadas com um açúcar não ligante, D-galactose (galactose), a 0,2M e posteriormente administradas nos grupos de células previamente determinados, especificados na tabela 3, seguido da administração dos agentes lesivos SATC, etanol e APO nas mesmas. Após a finalização dos tratamentos, todos os grupos foram incubados com o marcador nuclear Hoechst 33342 e com

iodeto de propídeo durante 5 min, seguido do processo de lavagem e visualização em microscópio confocal conforme descrito na metodologia anterior.

Tabela 2. Investigação do efeito do açúcar α -MM sobre as ações de ConA (200 μ g/ml) e ConBr (200 μ g/ml) nas células acinares pancreáticas sob administração de SATC, etanol ou APO.

Grupos	Administração	Tempo de Incubação	2ª Administração (Se houver)	Tempo de Incubação
I	Controle salina	1h	-	-
II	α -MM	1h	-	-
III	ConA/ α -MM	1h	-	-
IV	ConBr/ α -MM	1h	-	-
V	SATC ou Etanol ou APO	30 min	-	-
VI	ConA	1h	SATC ou Etanol ou APO	30 min
VII	ConBr	1h	SATC ou Etanol ou APO	30 min
VIII	ConA/ α -MM	1h	SATC ou Etanol ou APO	30 min
IX	ConBr/ α -MM	1h	SATC ou Etanol ou APO	30 min

Tabela 3. Investigação do efeito do açúcar galactose sobre as ações de ConA (200 μ g/ml) e ConBr (200 μ g/ml) nas células acinares pancreáticas sob administração de SATC, etanol ou APO.

Grupos	Administração	Tempo de Incubação	2ª Administração (Se houver)	Tempo de Incubação
I	Controle	1h	-	-
II	ConA/Galactose	1h	-	-
III	ConBr/Galactose	1h	-	-
IV	SATC ou Etanol ou APO	30 min	-	-
V	ConA	1h	SATC ou Etanol ou APO	30 min
VI	ConBr	1h	SATC ou Etanol ou APO	30 min
VII	ConA/Galactose	1h	SATC ou Etanol ou APO	30 min
VIII	ConBr/Galactose	1h	SATC ou Etanol ou APO	30 min

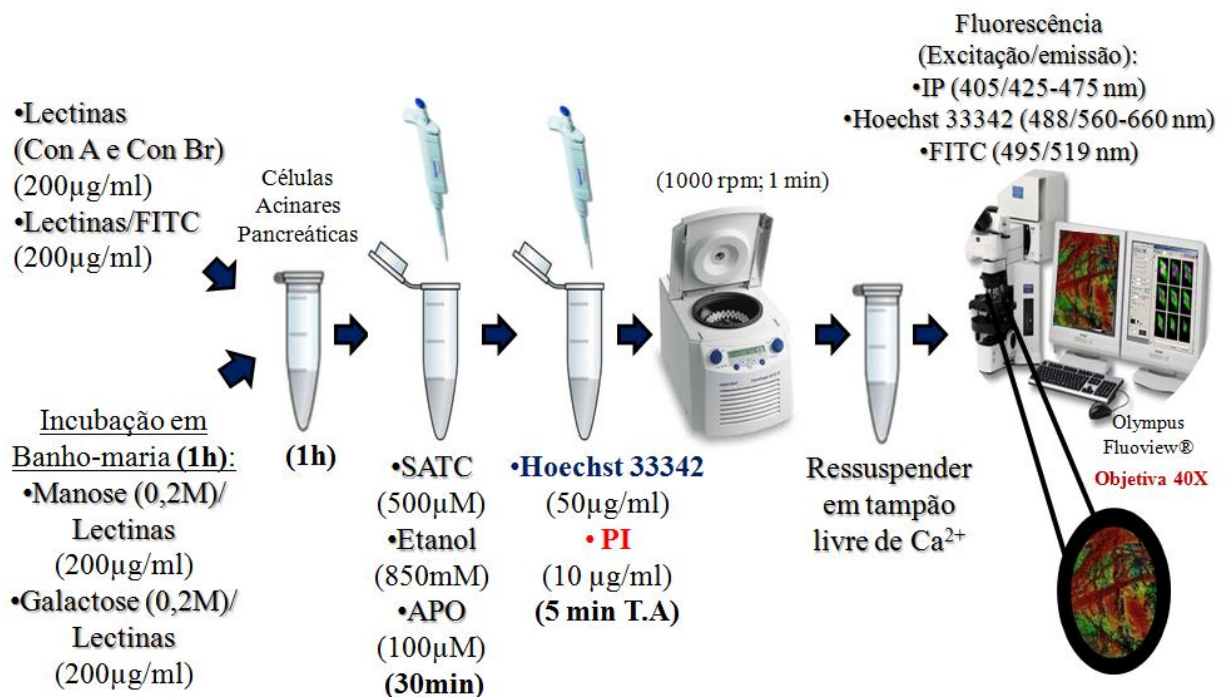
4.10. Observação da interação de ConA e ConBr conjugadas ao FITC com as células acinares pancreáticas

Em outra análise, Con A e Con Br conjugadas ao fluoróforo isotiocianato de fluoresceína (FITC) foram incubadas, durante 1h, com as células acinares pancreáticas, a fim de avaliar a interação das referidas lectinas com tais células. Nesta análise não houve incubação com Hoechst 33342 nem IP (Tabela 4). Ao final, as células foram centrifugadas (1000 rpm, 1 min), lavadas e ressuspensas em tampão livre de Ca^{2+} para posterior visualização no microscópio confocal FluoView™ 1000 – Olympus. A fluorescência de FITC (excitação/emissão: 495/519 nm) foi obtida utilizando a objetiva de imersão em água (60x). De cada grupo foram feitas 12 imagens de campos de visualização diferentes, com repetição em triplicata de cada experimento. A figura 18 ilustra as administrações dos diferentes grupos tratados até esse protocolo.

Tabela 4. Análise da interação de ConA (200 $\mu\text{g/ml}$) e ConBr (200 $\mu\text{g/ml}$) conjugadas ao FITC com as células acinares pancreáticas.

Grupos	Administração	Tempo de Incubação
I	ConA/FITC	1h
II	ConBr/FITC	1h

Figura 18. Representação esquemática do tratamento das células acinares pancreáticas.



4.11. Avaliação do papel de ConA e ConBr no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das células acinares pancreáticas sob administração de SATC, etanol ou APO

As estimativas de alterações no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foram feitas utilizando o marcador fluorescente tetrametilrodamina metilester (TMRM), que se acumula nas mitocôndrias impulsionado pelo potencial de membrana mitocondrial interna altamente negativo. As células acinares pancreáticas foram tratadas com ConA ou ConBr durante 1h, seguido da administração de SATC, etanol ou APO durante 30 min, em temperatura ambiente. Em seguida todos os grupos foram incubados com TMRM (100 nM) durante 15 min a 37°C e com Hoechst 33342 (50 µg/ml) durante 5 min para a contabilização dos núcleos celulares. Ao final deste processo, as células foram visualizadas no microscópio confocal FluoViewTM 1000 – Olympus. A fluorescência de Hoechst 33342 (excitação/emissão: 488/560-660 nm) e TMRM (excitação/emissão: 543/550-650) foram obtidas utilizando a objetiva de imersão em água – 60x. De cada grupo foram feitas 12 imagens de campos de visualização diferentes, com repetição em triplicata de cada experimento.

4.12. Análise estatística

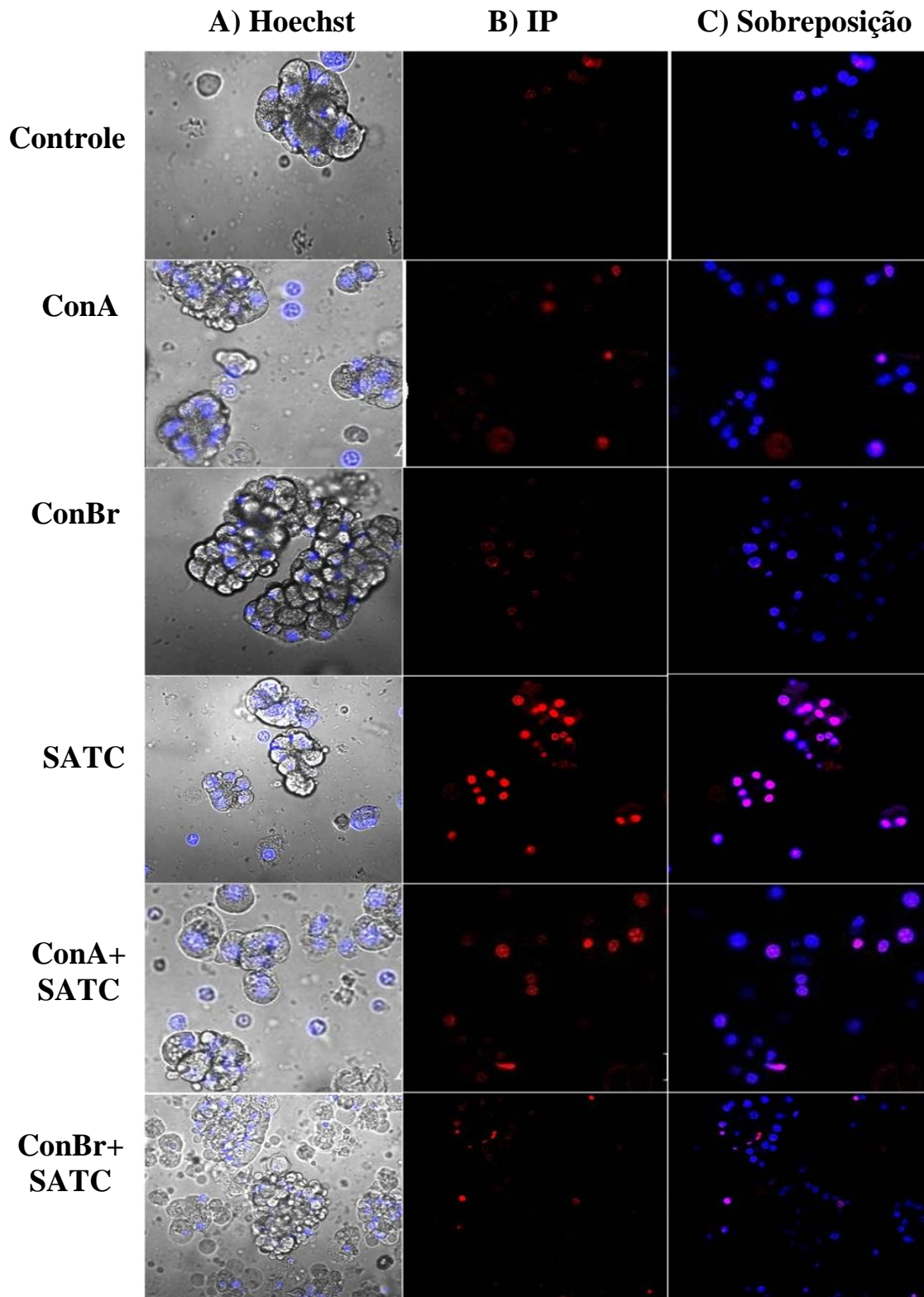
A análise dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism, versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através de one-way ANOVA seguido do teste de Bonferroni. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito de ConA e ConBr na necrose induzida por ácido taurolitocólico sulfatado, etanol ou ácido palmitoleico em células acinares pancreáticas

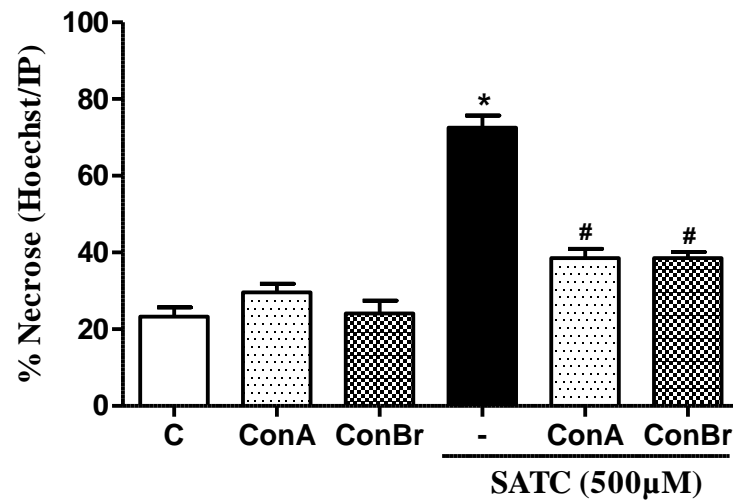
Após o isolamento primário, as células foram incubadas durante 1h com as lectinas ConA ou ConBr na concentração de 200 µg/ml. Após esse processo foi administrado nas mesmas SATC (500 µM), etanol (850 mM) ou APO (100 µM) e processado durante 30 minutos, conforme representado na tabela 1. Em dois grupos experimentais foi administrado ConA ou ConBr durante 1h sem pós-tratamento com SATC, etanol ou APO, seguida de posterior visualização no microscópio confocal, para avaliar a possibilidade de algum efeito lesivo às células, mediado pelas lectinas. Os resultados da porcentagem de necrose obtidos para estes grupos foram semelhantes aos do grupo controle ($23,25 \pm 2,47$), com médias \pm EPM de $29,64 \pm 2,24$ para Con A e $24,08 \pm 3,37$ para Con Br (figuras 19 e 20). A administração de SATC causou necrose significativa às células ($72,52 \pm 3,22$), quando comparado ao grupo controle. O pré-tratamento com ConA e ConBr ($38,51 \pm 2,433$ e $38,54 \pm 1,582$, respectivamente) protegeu significativamente ($p < 0,05$) as células contra a necrose induzida por SATC. Nas análises representadas pelas figuras 21, 22, 23 e 24, os resultados foram semelhantes ao anterior, onde ConA e ConBr protegeram de forma significativa ($p < 0,05$) a necrose induzida por etanol ($19,68 \pm 3,13$ para ConA e $24,11 \pm 2,90$ para ConBr *versus* $64,66 \pm 4,67$ para etanol) e APO ($21,63 \pm 1,51$ para ConA e $32,24 \pm 2,49$ para ConBr *versus* $64,85 \pm 2,15$ para APO).

Figura 19. Imagens do efeito de ConA e ConBr sobre as células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por ácido taurolitocólico sulfatado (SATC).



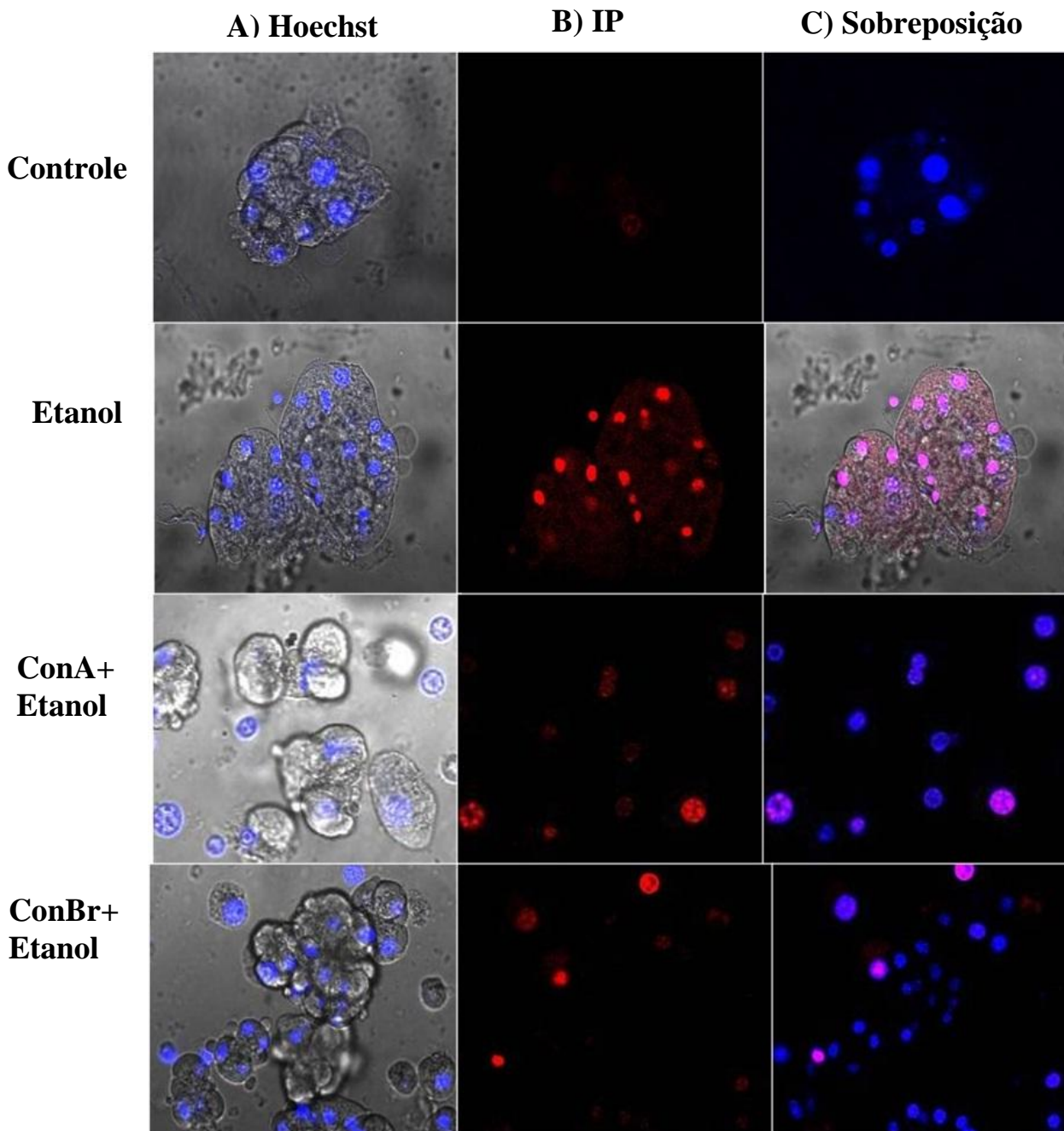
A) Marcação com Hoechst 33342 (em azul) dos núcleos das células totais. B) Células em necrose, núcleos marcados com iodeto de propídeo (IP; coloração vermelha). C) Sobreposição das imagens A e B, facilitando a visualização de quantas das células totais estão em necrose. Imagens obtidas em microscópio confocal FluoViewTM 1000 – Olympus, aumento de 400X.

Figura 20. Efeito de ConA e ConBr sobre as células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por ácido taurolitocólico sulfatado (SATC).



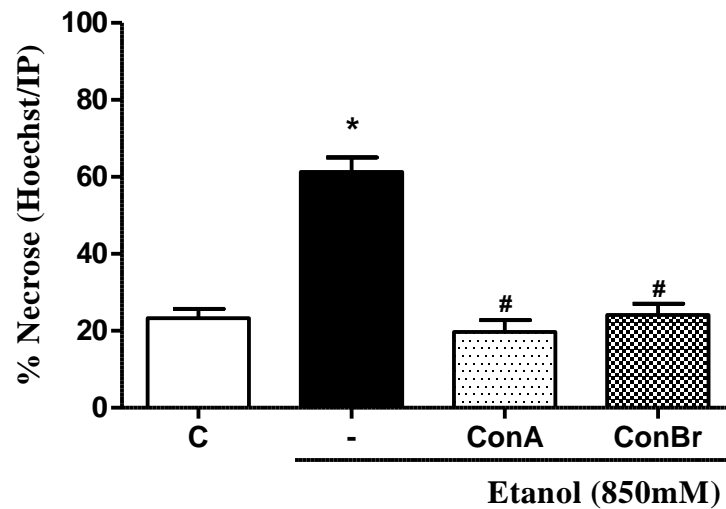
Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) da contagem de 15 campos de imagens obtidas em microscópio confocal FluoViewTM 1000 – Olympus, com análises repetidas em triplicata. A porcentagem (%) de necrose é dada através da relação de células marcadas com Hoechst 33342 e iodeto de propídeo (IP). * $p < 0,05$ vs grupo controle (C); # $p < 0,05$ vs grupo SATC. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

Figura 21. Imagens do efeito de ConA e ConBr sobre as células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por etanol.



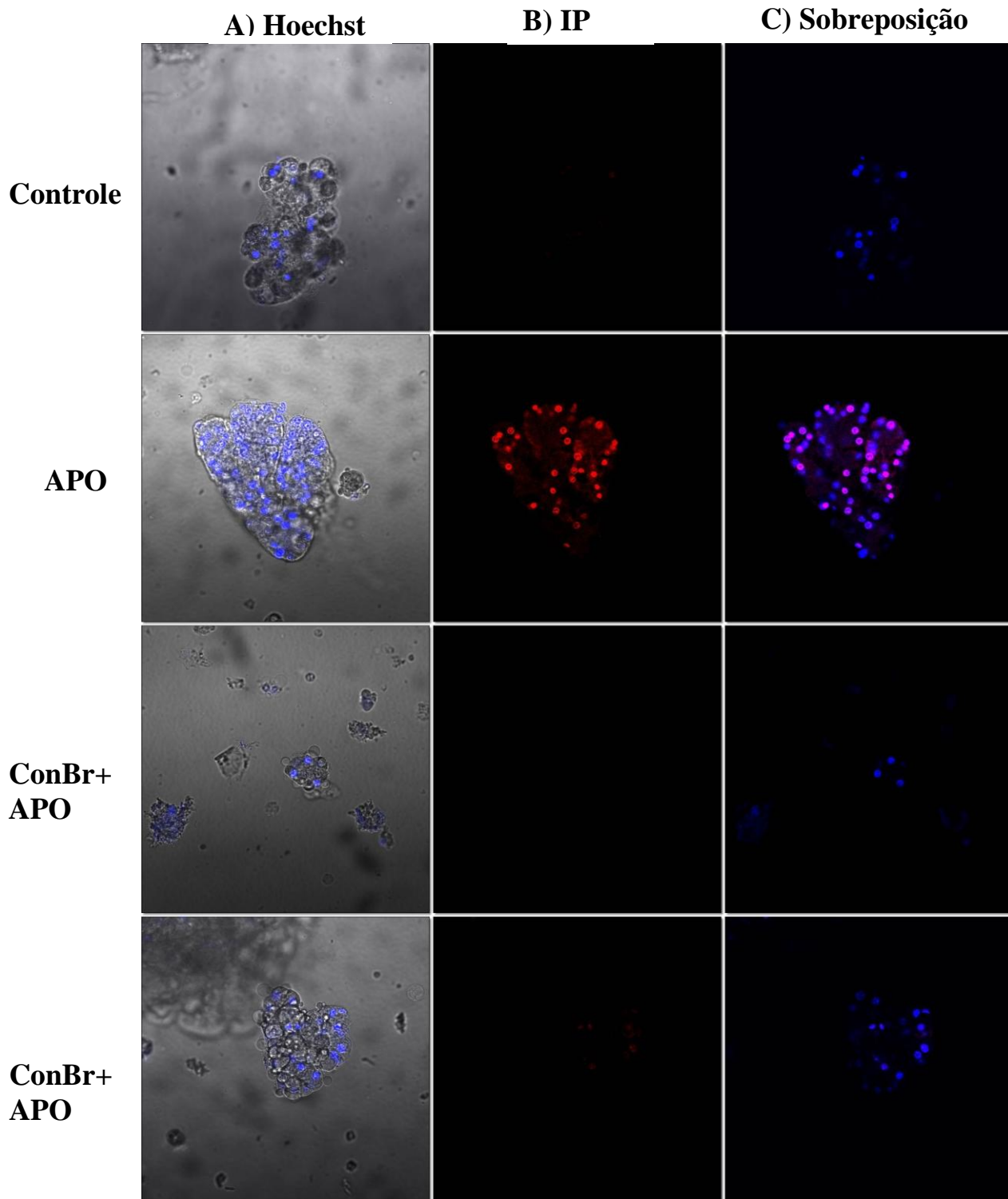
A) Marcação com Hoechst 33342 (em azul) dos núcleos das células totais presentes no campo de visualização. B) Células em necrose, núcleos marcados com iodeto de propídeo (IP; coloração vermelha). C) Sobreposição das imagens A e B, facilitando a visualização de quantas das células totais estão em necrose. Imagens obtidas em microscópio confocal FluoView™ 1000 – Olympus, aumento de 400X.

Figura 22. Efeito de ConA e ConBr sobre as células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por etanol.



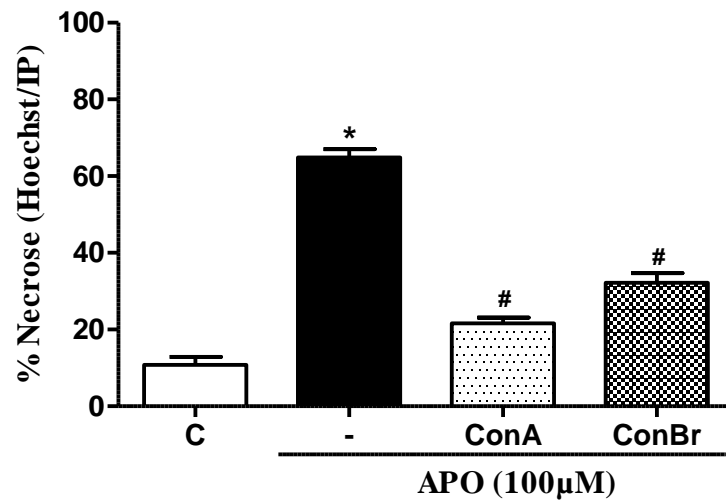
Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) da contagem de 15 campos de imagens obtidas em microscópio confocal FluoViewTM 1000 – Olympus, com análises repetidas em triplicata. A porcentagem de necrose é dada através da relação de células marcadas com Hoechst 33342 e iodeto de propídeo (IP). * $p < 0,05$ vs grupo controle (C); # $p < 0,05$ vs grupo etanol. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

Figura 23. Imagens do efeito de ConA e ConBr sobre as células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por ácido palmitoleico (APO).



A) Marcação com Hoechst 33342 (em azul) dos núcleos das células totais presentes no campo de visualização. B) Células em necrose, núcleos marcados com iodeto de propídeo (IP; coloração vermelha). C) Sobreposição das imagens A e B, facilitando a visualização de quantas das células totais estão em necrose. Imagens obtidas em microscópio confocal FluoView™ 1000 – Olympus, aumento de 400X.

Figura 24. Efeito de ConA e ConBr sobre as células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por ácido palmitoleico (APO).



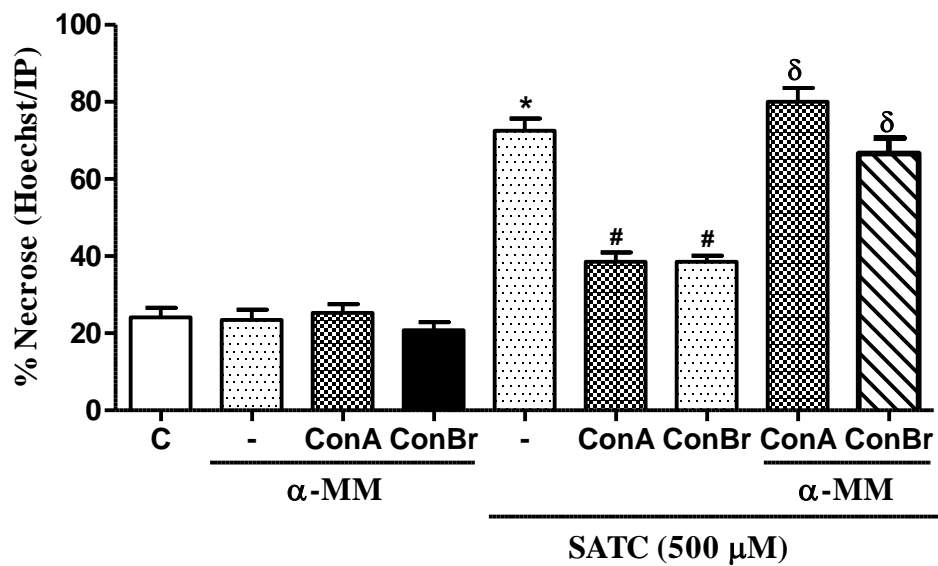
Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) da contagem de 15 campos de imagens obtidas em microscópio confocal FluoView™ 1000 – Olympus, com análises repetidas em triplicata. A porcentagem de necrose é dada através da relação de células marcadas com Hoechst 33342 e iodeto de propídeo (IP). * $p < 0,05$ vs grupo controle (C); # $p < 0,05$ vs grupo APO. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

5.2. Efeito do açúcar ligante (α -MM) nas ações de ConA e ConBr em células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por ácido taurolitocólico sulfatado, etanol ou ácido palmitoleico

Ao final do processo de incubação das lectinas com seu açúcar ligante específico, os grupos experimentais foram divididos, conforme ilustrado na tabela 2. Para avaliar a possibilidade de algum efeito lesivo às células mediado pelas lectinas incubadas com alfa-metil-manosídeo (α -MM) foram realizadas administrações de ConA/ α -MM ou ConBr/ α -MM em dois grupos de células, durante 1h. Após a marcação com Hoechst 33342 e IP, com posterior visualização ao microscópio confocal, a porcentagem de necrose dos grupos ConA/ α -MM e ConBr/ α -MM foram: $25,33 \pm 2,20$ e $20,76 \pm 2,13$, respectivamente, não havendo diferença significativa com o grupo controle salina ($24,14 \pm 2,47$). Quando as células foram pré-tratadas com ConA/ α -MM ou ConBr/ α -MM seguido do tratamento com os agentes lesivos, a prevenção da necrose mediada pelas lectinas (visualizada nas figuras 25, 26 e 27) foi significativamente revertida ($p < 0,05$) em todas as análises com SATC (necrose de $80,02 \pm 3,61$ % para ConA/ α -MM e $66,60 \pm 4,04$ % para ConBr/ α -MM *versus* $38,51 \pm 2,43$ ConA e $38,54 \pm 1,58$ ConBr – figura 25), etanol ($46,14 \pm 6$, 67 Con A/ α -MM e $78,70 \pm 5,01$ ConBr/ α -MM *versus* $19,68 \pm 3,13$ para ConA e $24,11 \pm 2,90$ para ConBr – figura 26) e APO ($49,43 \pm$

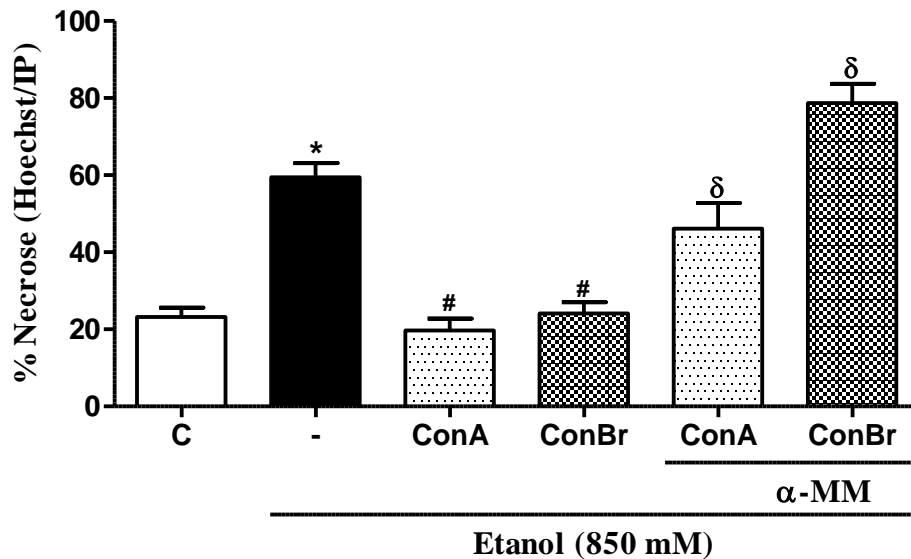
5, 22 Con A/ α -MM e $55,21 \pm 7,10$ Con Br/ α -MM *versus* $21,63 \pm 1,51$ para ConA e $32,24 \pm 2,49$ para Con Br). A administração de α -MM sozinho, não causou alterações nos padrões celulares, sem indícios de lesão, comparado com o grupo controle (figura 27).

Figura 25. Efeito do açúcar alfa-metil-manosídeo (α -MM) sobre as ações de ConA e ConBr em células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por ácido taurolitocólico sulfatado (SATC).



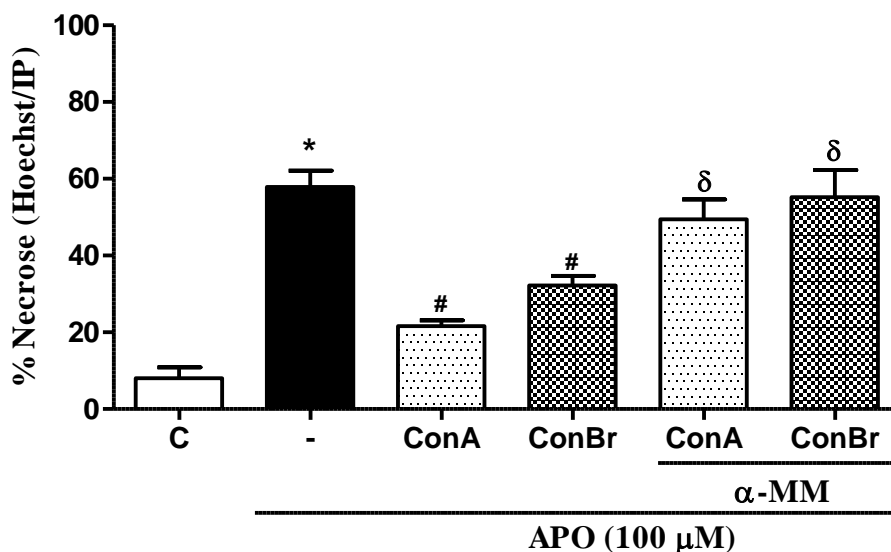
Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) da contagem de 15 campos de imagens obtidas em microscópio confocal FluoViewTM 1000 – Olympus, com análises repetidas em triplicata. A porcentagem de necrose é dada através da relação de células marcadas com Hoechst 33342 e Iodeto de propídeo (IP). * $p < 0,05$ vs grupo controle (C); # $p < 0,05$ vs grupo SATC; δ $p < 0,05$ vs grupos ConA e ConBr. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

Figura 26. Efeito do açúcar alfa-metil-manosídeo (α -MM) sobre as ações de ConA e ConBr em células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por etanol.



Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) da contagem de 15 campos de imagens obtidas em microscópio confocal FluoViewTM 1000 – Olympus, com análises repetidas em triplicata. A porcentagem de necrose é dada através da relação de células marcadas com Hoechst 33342 e iodeto de propídeo (IP). * $p < 0,05$ vs grupo controle (C); # $p < 0,05$ vs grupo Etanol; $\delta p < 0,05$ vs grupos ConA e ConBr. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

Figura 27. Efeito do açúcar alfa-metil-manosídeo (α -MM) sobre as ações de ConA e ConBr em células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por ácido palmítico (APO).



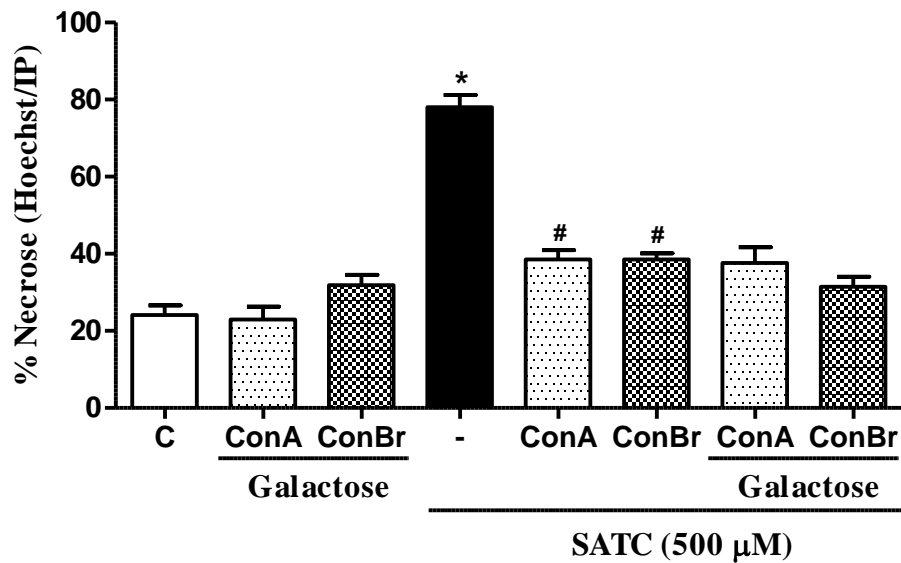
Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) da contagem de 15 campos de imagens obtidas em microscópio confocal FluoViewTM 1000 – Olympus, com

análises repetidas em triplicata. A porcentagem de necrose é dada através da relação de células marcadas com Hoechst 33342 e iodeto de propídeo (IP). * $p < 0,05$ vs grupo controle (C); # $p < 0,05$ vs grupo APO; $\delta p < 0,05$ vs grupos ConA e ConBr. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

5.3. Efeito do açúcar não ligante (galactose) nas ações de ConA e ConBr em células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por ácido taurolitocólico sulfatado, etanol ou ácido palmitoleico

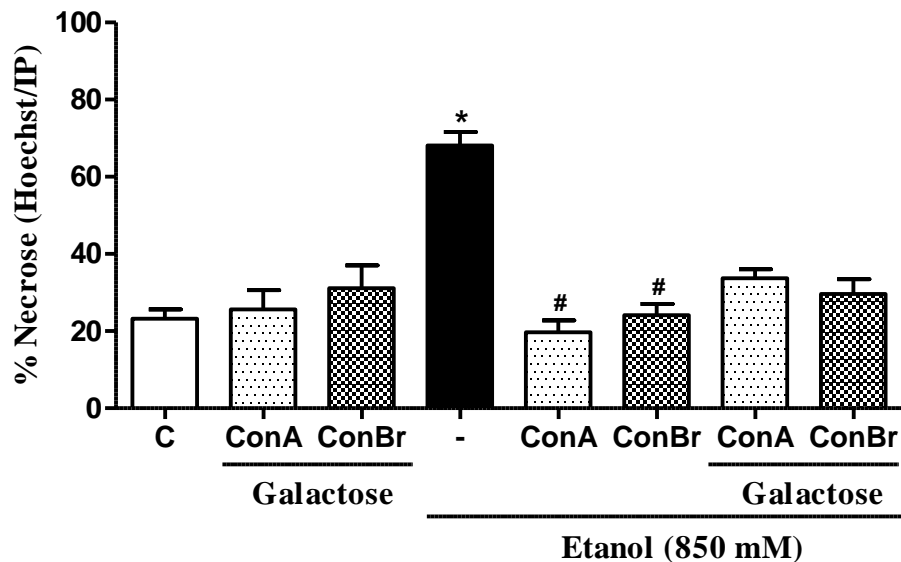
Para avaliar o efeito do açúcar não ligante, galactose, no efeito de ConA e ConBr sobre as células acinares pancreáticas estimuladas por SATC, etanol ou APO, os grupos experimentais foram divididos conforme ilustrado na tabela 3. Como visto anteriormente, a necrose causada por 3 agentes foi significativamente ($p < 0,05$) prevenida pelo pré-tratamento com ConA e ConBr (médias \pm EPM de $38,51 \pm 2,433$ e $38,54 \pm 1,582$, respectivamente *versus* grupo SATC; $19,68 \pm 3,13$ e $24,11 \pm 2,90$, respectivamente *versus* grupo etanol e $21,63 \pm 1,51$ e $32,24 \pm 2,49$, respectivamente para ConA e ConBr *versus* grupo APO). Quando as células foram pré-tratadas com ConA/Galactose e ConBr/Galactose, seguido de posteriores tratamentos com SATC, etanol ou APO, a prevenção da necrose mediada pelas lectinas não foi alterada, com as médias \pm EPM da porcentagem de necrose de $37,62 \pm 4,10$ para ConA/Galactose e $31,42 \pm 2,64$ para ConBr/Galactose (análise com SATC – Figura 28); $33,74 \pm 2,26$ para ConA/Galactose e $29,61 \pm 3,88$ para ConBr/Galactose (análise com etanol – Figura 29) e $33,77 \pm 4,23$ para ConA/Galactose $34,84 \pm 4,06$ para ConBr/Galactose (análise com APO – Figura 30).

Figura 28. Efeito do açúcar galactose sobre as ações de ConA e ConBr em células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por ácido taurolitocólico sulfatado (SATC).



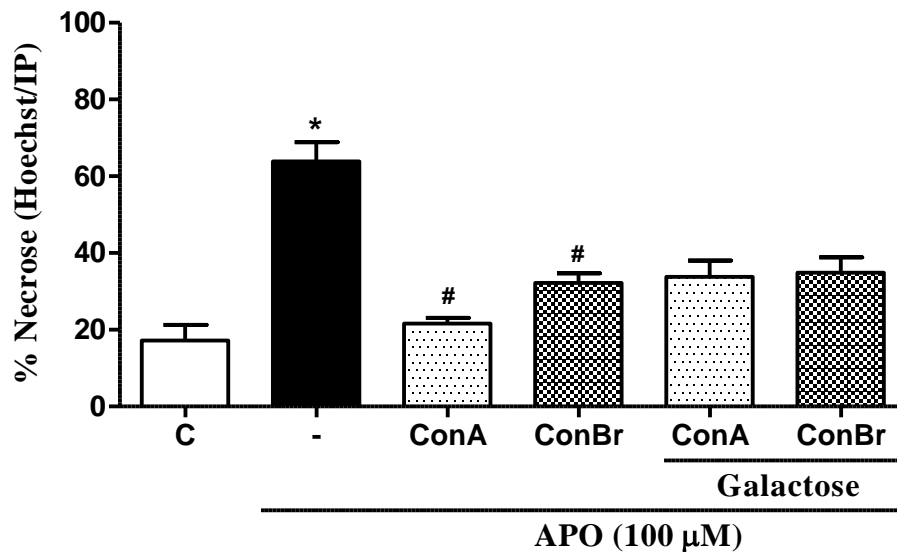
Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) da contagem de 15 campos de imagens obtidas em microscópio confocal FluoView™ 1000 – Olympus, com análises repetidas em triplicata. A porcentagem de necrose é dada através da relação de células marcadas com Hoechst 33342 e iodeto de propídeo (IP). * $p < 0,05$ vs grupo controle (C); # $p < 0,05$ vs grupo SATC. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

Figura 29. Efeito do açúcar galactose sobre as ações de ConA e ConBr em células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por etanol.



Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) da contagem de 15 campos de imagens obtidas em microscópio confocal FluoView™ 1000 – Olympus, com análises repetidas em triplicata. A porcentagem de necrose é dada através da relação de células marcadas com Hoechst 33342 e iodeto de propídeo (IP). * $p < 0,05$ vs grupo controle (C); # $p < 0,05$ vs grupo Etanol. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

Figura 30. Efeito do açúcar galactose sobre as ações de ConA e ConBr em células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por ácido palmitoleico (APO).

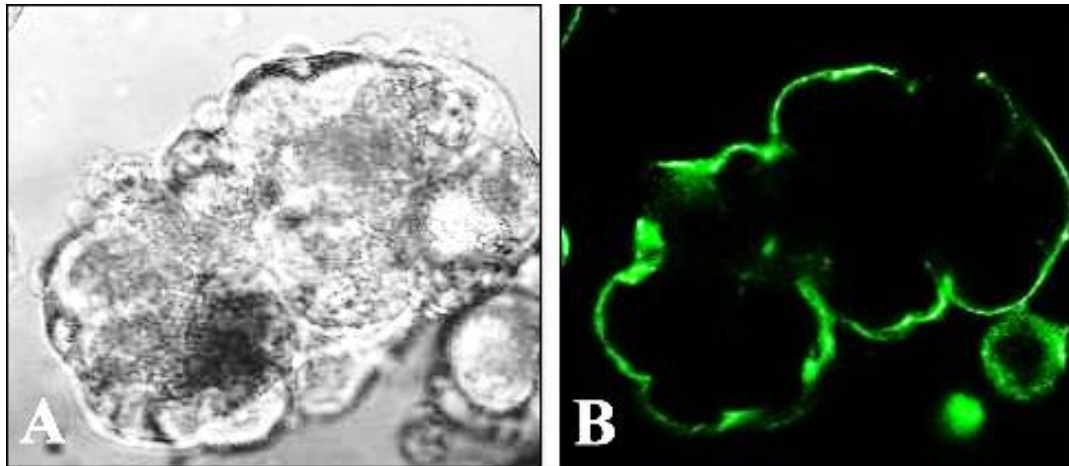


Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) da contagem de 15 campos de imagens obtidas em microscópio confocal FluoView™ 1000 – Olympus, com análises repetidas em triplicata. A porcentagem de necrose é dada através da relação de células marcadas com Hoechst 33342 e iodeto de propídeo (IP). * $p < 0,05$ vs grupo controle (C); # $p < 0,05$ vs grupo Etanol. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

5.4. Avaliação da interação de ConA/FITC e ConBr/FITC com as células acinares pancreáticas

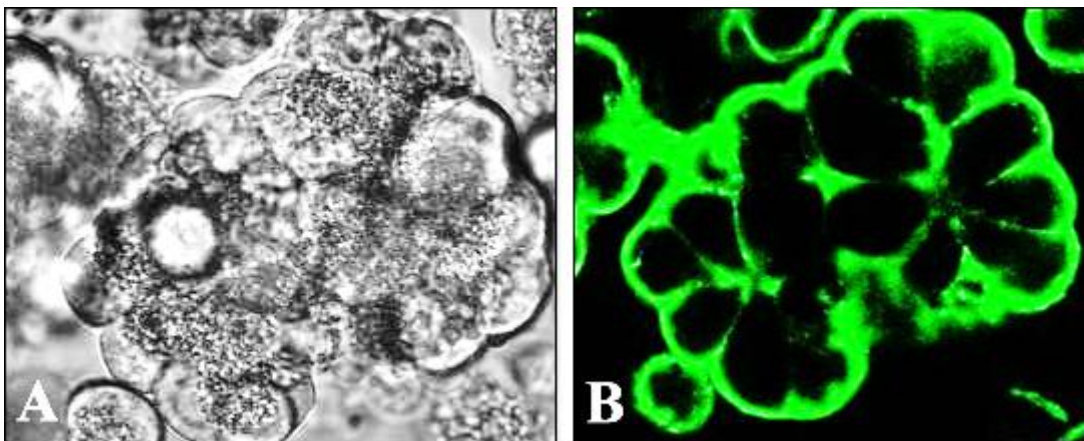
A fim de observar a interação das lectinas em estudo com as células acinares pancreáticas, Con A e Con Br conjugadas ao FITC foram incubadas, durante 1h, com as células. Após observação em microscopia confocal, as imagens obtidas evidenciaram que a interação das duas lectinas com as células acinares ocorre através de ligação na membrana acinar (Figuras 31 e 32).

Figura 31. Interação de ConA/FITC com células acinares pancreáticas.



Imagens obtidas em microscópio confocal FluoView™ 1000 – Olympus, aumento de 600X.

Figura 32. Interação de Con Br/FITC com células acinares pancreáticas.



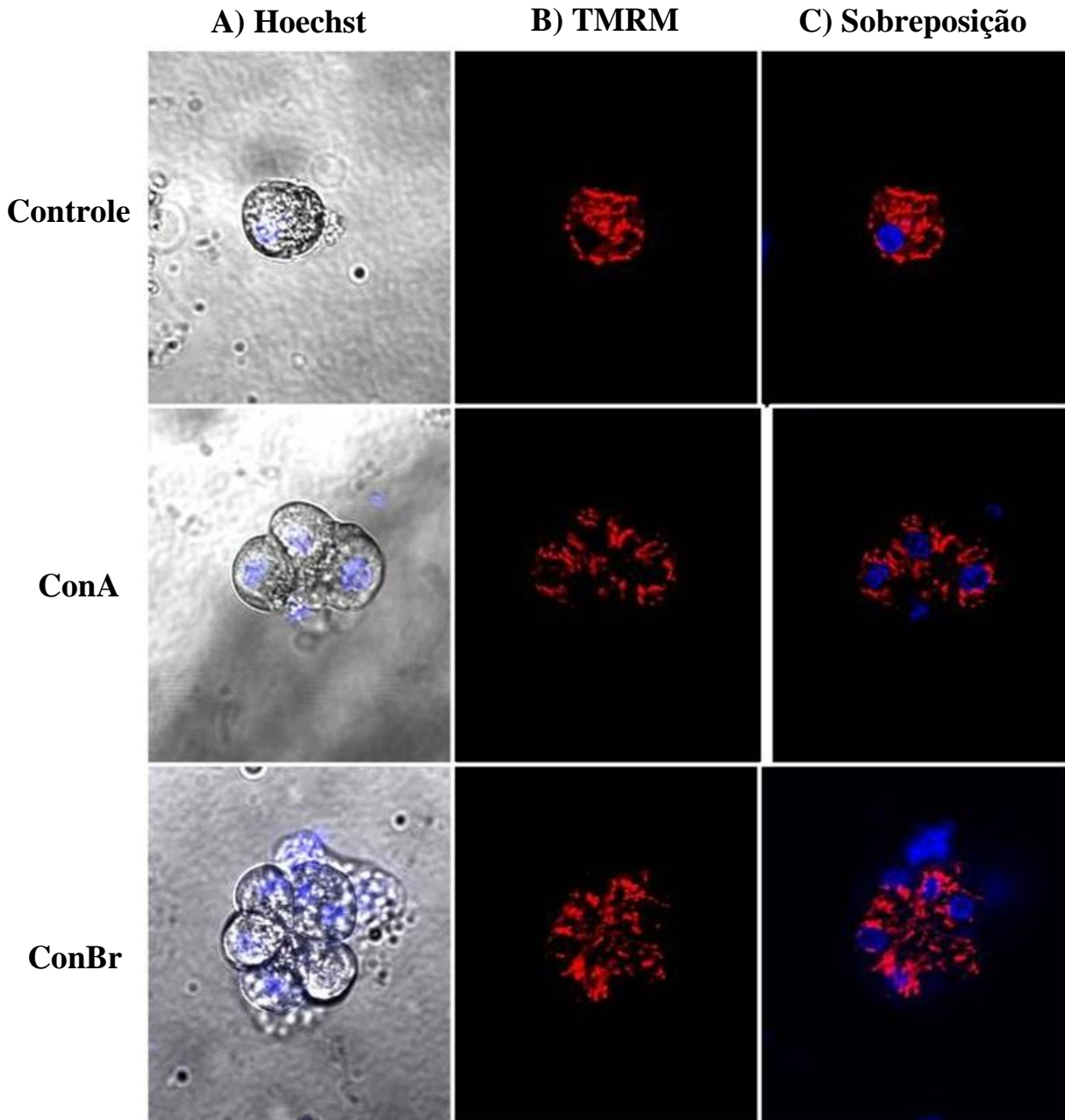
Imagens obtidas em microscópio confocal FluoView™ 1000 – Olympus, aumento de 600X.

5.5. Papel de ConA e ConBr no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das células acinares pancreáticas sob administração de SATC, etanol ou APO

Para esta análise experimental, inicialmente foram avaliados dois grupos controles, de tratamento com ConA e ConBr durante 1h, para analisar a possibilidade das lectinas causarem alguma disfunção no potencial de membrana mitocondrial das células acinares pancreáticas. As lectinas não alteraram o potencial de membrana mitocondrial das células (despolarização mitocondrial de $18,22 \pm 3,81\%$ para células incubadas com ConA e $9,67 \pm 3,30\%$ para ConBr) quando comparado ao grupo de células tratadas com o veículo (controle salina, $11,99 \pm 2,20\%$). Em contrapartida, as células acinares pancreáticas expostas ao SATC, exibiram despolarização do $\Delta\Psi_m$ em $69,46 \pm 6,64\%$ das células, uma porcentagem significativamente ($p < 0,05$) maior que nas células tratadas com o veículo. O número de células que sofreram

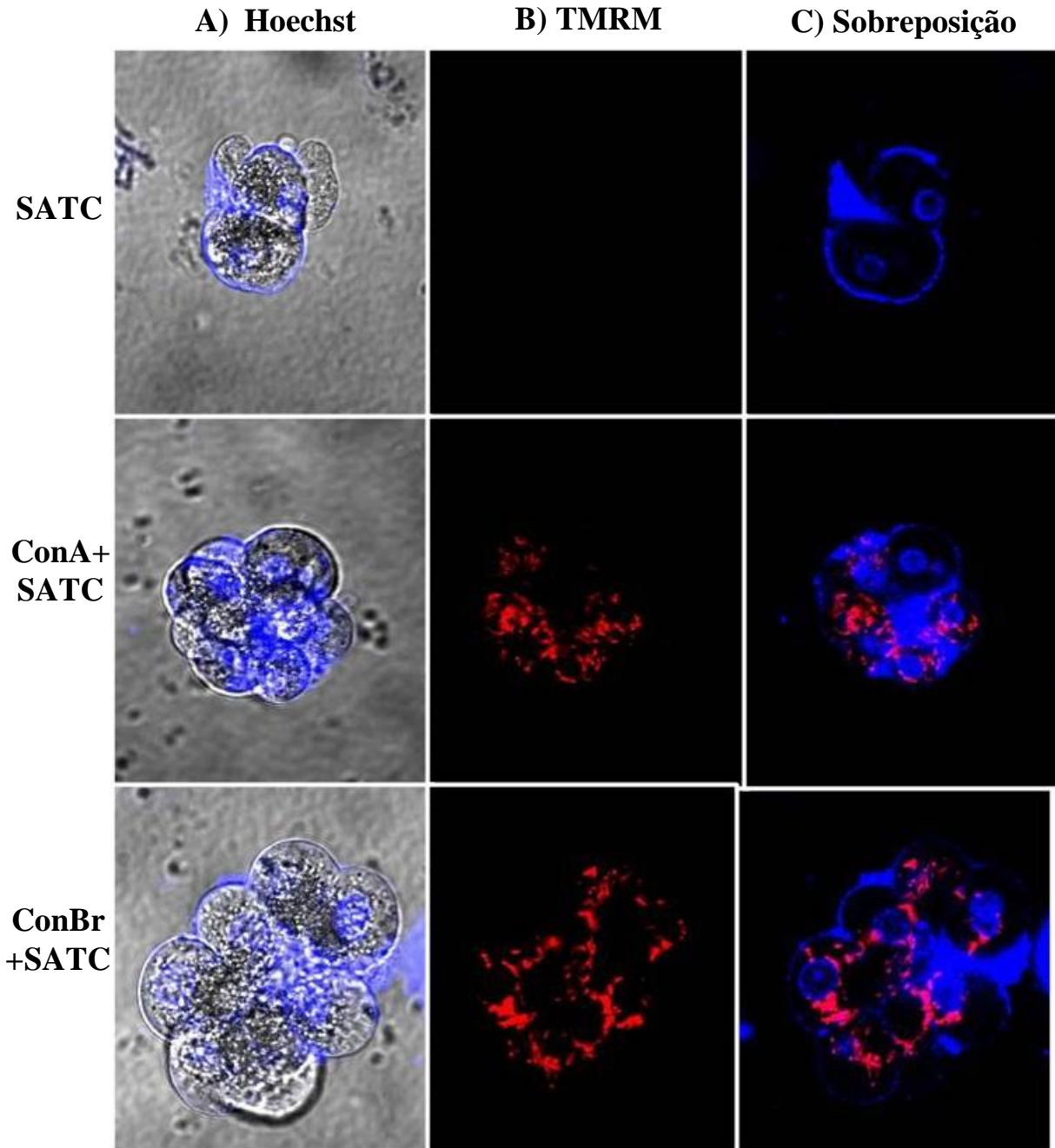
despolarização do $\Delta\Psi_m$ após exposição ao SATC foi significativamente ($p < 0,05$) reduzido quando as mesmas foram pré-incubadas por 1h com ConA ($25,17 \pm 3,89\%$) e ConBr ($28,89 \pm 5,61\%$), (figuras 33 e 34). Da mesma forma, as células acinares pancreáticas, sob exposição ao etanol, exibiram despolarização do $\Delta\Psi_m$ em uma quantidade significativa ($p < 0,05$) de células ($68,73 \pm 5,38\%$) quando comparado ao grupo controle ($11,77 \pm 3,34\%$). Quando as células foram pré-tratadas com ConA ou ConBr durante 1h antes da administração de etanol, a despolarização do $\Delta\Psi_m$ das mesmas foi significativamente ($p < 0,05$) reduzida (ConA: $23,57 \pm 3,54\%$ e ConBr: $22,54 \pm 2,74\%$; figuras 35 e 36). Em outro modelo de lesão pancreática, o ácido palmitoleico (APO) causou intensa despolarização mitocondrial em quase a totalidade de células analisadas ($98,00 \pm 1,39\%$), comparado ao grupo controle ($14,21 \pm 2,63\%$). O pré-tratamento com ConA durante 1h conseguiu reduzir significativamente ($p < 0,05$) a porcentagem de células com despolarização mitocondrial para $75,92 \pm 8,99\%$ em relação ao grupo APO. Porém, o pré-tratamento com ConBr, apesar de mostrar uma tendência de redução da despolarização mitocondrial ($81,88 \pm 7,49\%$), comparado ao grupo APO, não apresentou diferença significativa (figuras 37 e 38).

Figura 33. Imagens do efeito de ConA e ConBr no $\Delta\Psi_m$ de células acinares pancreáticas sob administração de SATC.



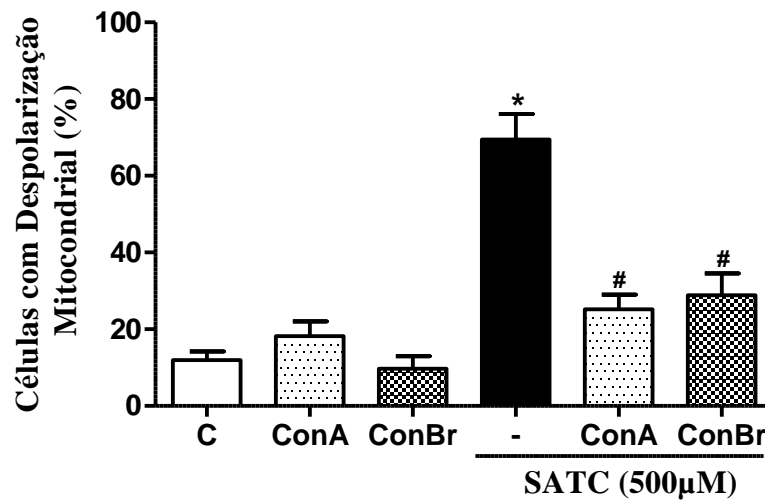
A) Marcação com Hoechst 33342 (em azul) dos núcleos das células totais presentes no campo de visualização. B) Marcação de mitocôndrias com TMRM, (coloração vermelha). C) Sobreposição das imagens A e B, facilitando a visualização e quantificação das células. A porcentagem (%) de despolarização mitocondrial é dada através da relação de células marcadas com Hoechst 33342 e TMRM, onde uma diminuição da fluorescência relativa de TMRM representa despolarização mitocondrial. Imagens obtidas em microscópio confocal FluoView™ 1000 – Olympus, aumento de 600X.

Figura 34. Continuação. Imagens do efeito de ConA e ConBr no $\Delta\Psi_m$ de células acinares pancreáticas sob administração de SATC.



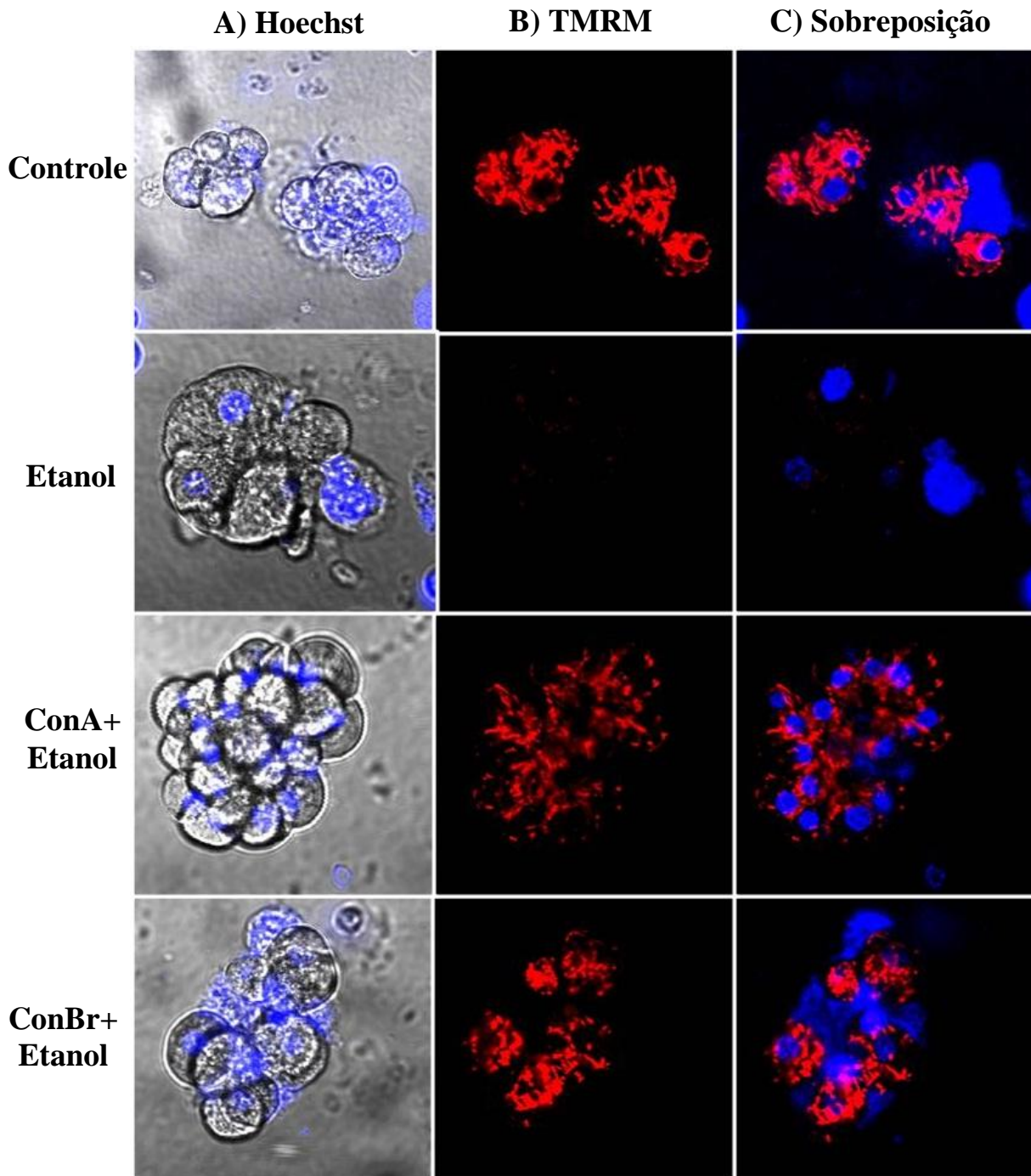
A) Marcação com Hoechst 33342 (em azul) dos núcleos das células totais presentes no campo de visualização. B) Marcação de mitocôndrias com TMRM, (coloração vermelha). C) Sobreposição das imagens A e B, facilitando a visualização e quantificação das células. A porcentagem (%) de despolarização mitocondrial é dada através da relação de células marcadas com Hoechst 33342 e TMRM, onde uma diminuição da fluorescência relativa de TMRM representa despolarização mitocondrial. Imagens obtidas em microscópio confocal FluoViewTM 1000 – Olympus, aumento de 600X.

Figura 35. Efeito de ConA e ConBr no $\Delta\Psi_m$ de células acinares pancreáticas sob administração de SATC.



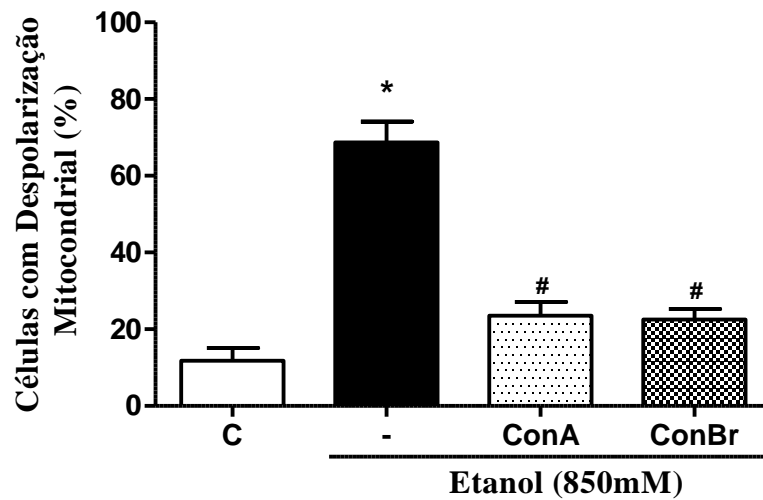
Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) da contagem de 15 campos de imagens obtidas em microscópio confocal FluoViewTM 1000 – Olympus, com análises repetidas em triplicata. A porcentagem de despolarização mitocondrial é dada através da relação de células marcadas com Hoechst 33342 e TMRM, onde uma diminuição da fluorescência relativa de TMRM representa despolarização mitocondrial. * $p < 0,05$ vs grupo controle (C); # $p < 0,05$ vs grupo SATC. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

Figura 36. Efeito de ConA e ConBr no $\Delta\Psi_m$ de células acinares pancreáticas sob administração de etanol.



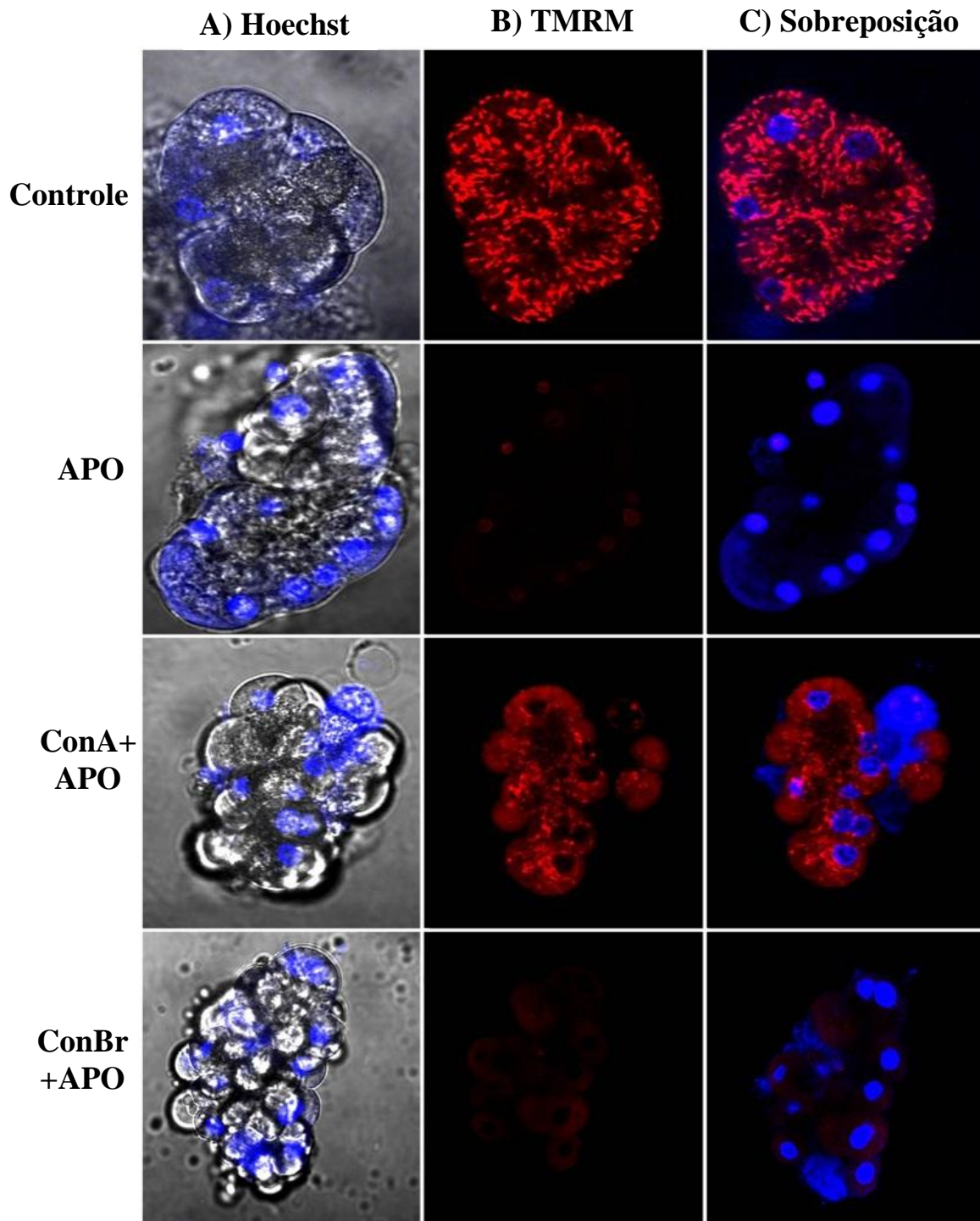
A) Marcação com Hoechst 33342 (em azul) dos núcleos das células totais presentes no campo de visualização. B) Marcação de mitocôndrias com TMRM, (coloração vermelha). C) Sobreposição das imagens A e B, facilitando a visualização e quantificação das células. A porcentagem (%) de despolarização mitocondrial é dada através da relação de células marcadas com Hoechst 33342 e TMRM, onde uma diminuição da fluorescência relativa de TMRM representa despolarização mitocondrial. Imagens obtidas em microscópio confocal FluoView™ 1000 – Olympus, aumento de 600X.

Figura 37. Efeito de ConA e ConBr no $\Delta\Psi_m$ de células acinares pancreáticas sob administração de etanol.



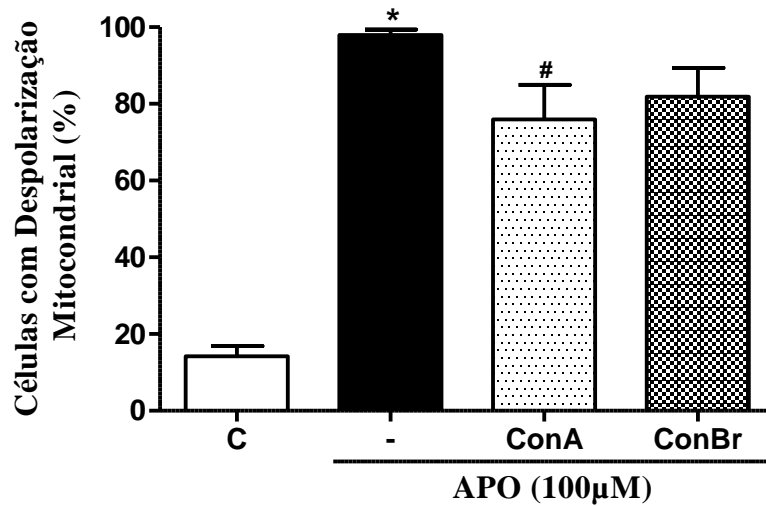
Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) da contagem de 15 campos de imagens obtidas em microscópio confocal FluoViewTM 1000 – Olympus, com análises repetidas em triplicata. A porcentagem de despolarização mitocondrial é dada através da relação de células marcadas com Hoechst 33342 e TMRM, onde uma diminuição da fluorescência relativa de TMRM representa despolarização mitocondrial. *p < 0,05 vs grupo controle (C); #p < 0,05 vs grupo etanol. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

Figura 38. Imagens do efeito de ConA e ConBr no $\Delta\Psi_m$ de células acinares pancreáticas sob administração de APO.



A) Marcação com Hoechst 33342 (em azul) dos núcleos das células totais presentes no campo de visualização. B) Marcação de mitocôndrias com TMRM, (coloração vermelha). C) Sobreposição das imagens A e B, facilitando a visualização e quantificação das células. A porcentagem de despolarização mitocondrial é dada através da relação de células marcadas com Hoechst 33342 e TMRM, onde uma diminuição da fluorescência relativa de TMRM representa despolarização mitocondrial. Imagens obtidas em microscópio confocal FluoViewTM 1000 – Olympus, aumento de 600X.

Figura 39. Efeito de ConA e ConBr no $\Delta\Psi_m$ de células acinares pancreáticas sob administração de APO.



Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) da contagem de 15 campos de imagens obtidas em microscópio confocal FluoViewTM 1000 – Olympus, com análises repetidas em triplicata. A porcentagem de despolarização mitocondrial é dada através da relação de células marcadas com Hoechst 33342 e TMRM, onde uma diminuição da fluorescência relativa de TMRM representa despolarização mitocondrial. * $p < 0,05$ vs grupo controle (C); # $p < 0,05$ vs grupo APO. One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho mostram, pioneiramente, que ConA e ConBr diminuem significativamente a necrose das células acinares pancreáticas provocada por ácido taurolitocólico sulfatado, etanol ou ácido palmitoleico, e que este efeito é mediado, pelo menos em parte, através do domínio lectínico de ambas as proteínas. Corroborando com essas evidências, foi demonstrado, através da conjugação de ConA e ConBr ao marcador fluorescente isotiocianato de fluoresceína (FITC), que a interação dessas lectinas com as células acinares pancreáticas se dá a nível de membrana celular. Além disso, os dados do presente estudo mostram que ConA previne a despolarização do $\Delta\Psi_m$ das células acinares causada por SATC, etanol e APO, e ConBr também protege as células da disfunção mitocondrial causada por SATC e etanol, apesar de não mostrar proteção significativa contra APO.

A pancreatite aguda (PA) é, na maioria dos casos, uma doença inflamatória, autolimitada e que se resolve com medidas clínicas. Todavia, a presença de necrose pancreática e peripancreática, associada à infecção, é potencialmente grave e pode demandar cuidados e abordagens especializadas (TOOLI et al., 2002). Dentre as principais causas de PA, estão a passagem de cálculo pelo ducto biliar comum e o excesso de ingestão alcoólica, que, juntos, correspondem a aproximadamente 80% dos casos (BECKNGHAM; BORNMAN, 2001). Alguns estudos recentes têm atribuído como um dos principais fatores causais de lesão pancreática pelo álcool, os metabólitos da sua via não oxidativa, como, por exemplo, o ácido palmitoleico (CRIDDLE et al., 2004). Diante desses três importantes fatores envolvidos na etiologia da pancreatite aguda, diversos estudos buscam efetivamente compreender cada mecanismo envolvido nesses modelos, a fim de melhor compreender a fisiopatologia da pancreatite aguda, bem como buscar possíveis alternativas terapêuticas.

A litíase biliar (incluindo microlitíase), uma doença que consiste na formação de cálculos no trato biliar, é causa mais comum de pancreatite aguda nos países ocidentais, sendo responsável por 35% a 60% dos casos (THIRUVENGADAM et al., 2012). A patogênese é multifacetada, estando, entre outras causas, relacionada com a obstrução transitória da luz do ducto pancreático, impedindo o fluxo de secreção pancreática (THIRUVENGADAM et al., 2012; FELDMAN; FRIEDMAN; BRANDT, 2010), essa obstrução leva a um aumento transitório da pressão no canal de Wirsung, com extravasamento de suco pancreático para o interstício glandular e consequente lesão (ROSA et al., 2004; VEGE; WHITCOMB; GROVER, 2012).

Em células acinares pancreáticas isoladas, os ácidos biliares aumentam a concentração de cálcio citosólico $[Ca^{2+}]_c$ via ativação do receptor de proteína G, Gpbar1 (um receptor de superfície celular ativado por ácidos biliares), que libera Ca^{2+} de armazenamentos intracelulares e inibe a bomba Ca^{2+} -ATPase do retículo endoplasmático, provocando colapso mitocondrial e induzindo necrose (BOOTH et al., 2011).

O sal dissódico de ácido taurolitocólico 3-sulfato (SATC) é um sal biliar natural, utilizado experimentalmente em diversos ensaios, principalmente para avaliar efeitos fisiológicos ou patológicos de ácidos biliares em células acinares pancreáticas (VORONINA et al., 2005). Estudos com a utilização desse sal biliar mostraram que a concentração de 500 μ M/L representa o modelo ideal de indução de lesão celular por necrose em células acinares pancreáticas, obtidas por isolamento primário (BOOTH et al., 2011). No presente estudo, o tratamento das células com ácido taurolitocólico sulfatado promoveu lesão nas células acinares pancreáticas, apresentando um percentual de necrose significativo quando comparado com o grupo controle. Quando as células acinares foram previamente incubadas com ConA ou ConBr, a necrose induzida por SATC foi significativamente reduzida, o que sugere uma proteção celular mediada pelas lectinas ConA e ConBr nesse modelo de lesão pancreática induzida por ácidos biliares. A partir desse resultado obtido surgem algumas hipóteses de atuação dessas lectinas, onde, por exemplo, elas podem estar competindo pelo mesmo sítio de ligação dos ácidos biliares, o Gpbar1, e dessa forma impedem a ativação desses receptores, evitando a liberação de Ca^{2+} em excesso e subsequente despolarização mitocondrial, evitando assim a necrose. Alguns estudos têm mostrado, por exemplo, que ConA interage com receptores de superfície de células tumorais hepáticas, mediando eventos no interior da célula (LEI; CHANG, 2009).

O alcoolismo é a segunda causa mais comum de pancreatite, e a pancreatite alcoólica recorrente leva à pancreatite crônica (AMMANN; MUELLHAUPT, 1994). O mecanismo de lesão induzido pelo etanol ainda não é totalmente esclarecido. As hipóteses incluem: toxicidade pancreática direta, estimulação da secreção pancreática (secundária a um aumento de secreção gástrica) com aumento da pressão intra-ductal, espasmo do esfíncter de Oddi, aumento da permeabilidade do ducto pancreático, aumento da concentração protéica no suco pancreático com precipitação nos pequenos ductos glandulares e hipoperfusão pancreática (ROSA et al., 2004). As hipóteses que vêm surgindo recentemente sustentam a idéia de que o etanol provoca alterações na célula acinar que levam a aumento de $[Ca^{2+}]_c$, culminando em disfunção mitocondrial e necrose (MALÉTH et al., 2013).

O pâncreas pode metabolizar o álcool por meio de duas vias: a oxidativa e a não oxidativa, produzindo os metabólitos tóxicos acetaldeído e etil ésteres de ácidos graxos, respectivamente. A via oxidativa é catalisada pela enzima álcool-desidrogenase (ADH) com contribuições do citocromo P4502E1 (CYP2E1) e, em menor extensão, pela catalase (HABER et al., 1998). O acetaldeído, produto do metabolismo oxidativo do etanol, tem sido relacionado com a inibição da secreção celular acinar, estimulada fisiologicamente por colecistocinina, mais provavelmente via disfunção microtubular e perturbações do citoesqueleto de actina (efeitos que inibem a exocitose) (SANKARAN et al., 1985). Outra consequência metabólica da oxidação alcoólica que pode contribuir para a lesão acinar é uma alteração no estado redox da célula acinar (uma redução da razão (NAD)/(NADH) e aumento da razão (lactato)/(piruvato), secundária ao aumento da produção de íons hidrogênio (equivalentes redutores) (LIEBER, 1992). Estudos experimentais e clínicos têm demonstrado que o consumo de álcool causa estresse oxidativo dentro do pâncreas, que acredita-se desempenhar um papel na desestabilização dos grânulos de zimogênio e lisossomos induzida pelo etanol (NORTON et al., 1998; DRYDEN et al., 2005).

Diante do exposto, o estudo de modelos celulares de lesão pancreática induzida por etanol é crítico para entender a fisiopatologia da PA. Assim sendo, foi avaliado no presente trabalho o papel de ConA e ConBr na necrose celular induzida por etanol. Neste modelo de lesão foi utilizado etanol absoluto (850 mM), não havendo distinção das suas vias metabólicas, dessa forma a lesão celular se deu tanto pela via oxidativa quanto pela via não oxidativa. Os resultados obtidos mostraram que a necrose das células acinares pancreáticas induzida pela incubação por 30 minutos de etanol foi significativamente revertida com o pré-tratamento durante 1h com ConA e ConBr, o que mostra uma versatilidade farmacológica dessas lectinas de promoverem proteção da célula acinar em modelos distintos de lesão pancreática.

Os metabólitos não-oxidativos do etanol, etil éster de ácidos graxos (EEAGs), têm a capacidade de danificar o pâncreas, talvez sendo a principal via de lesão deste agente (CRIDDLE et al., 2006). A via não-oxidativa do metabolismo alcoólico envolve a esterificação do álcool com ácidos graxos para formar etil ésteres de ácidos graxos, uma reação catalisada pela enzima etil éster de ácidos graxos sintetase (EEAG sintetase). É interessante notar que o pâncreas exibe atividade EEAG-sintetase, que é várias vezes mais elevada que a observada no fígado (GUKOVSKAYA et al., 2002), e que EEAGs podem se acumular no pâncreas humano e de ratos após consumo de álcool (LANGE, 1982; GUKOVSKAYA et al., 2002; HABER et al., 2004; WERNER et al., 2001).

A infusão de EEAGs em ratos causa edema pancreático, vacuolização da célula acinar, ativação do tripsinogênio e aumento dos níveis de proteína da matriz extracelular na glândula (este último efeito pode ser de relevância para o desenvolvimento de fibrose pancreática induzida por etanol) (LUGEA et al., 2003; WERNER et al., 1997). EEAGs, em concentrações conhecidas *in vivo*, desestabilizam lisossomos em células acinares pancreáticas, este efeito pode aumentar o potencial para contato entre enzimas lisossomais e enzimas digestivas, facilitando a ativação intracelular prematura destas últimas (MINOTI et al., 2010). Os mecanismos pelos quais EEAGs exercem seus efeitos tóxicos têm recebido considerável atenção nos últimos anos. As possíveis vias incluem: interação direta dos compostos com membranas celulares (HUNGUND et al., 1988) e liberação de ácidos graxos livres por hidrólise de EEAGs, um processo que pode contribuir para dano mitocondrial (LANGE; SOBEL, 1983).

Alterações na concentração de cálcio intracelular, um importante segundo mensageiro, tem também sido relatada em resposta ao álcool e EEAGs. Criddle e colaboradores (2006) têm mostrado que a exposição de células acinares pancreáticas *in vitro* ao EEAG, nomeadamente etil éster de ácido palmitoleico (EEAPO) causa um sustentado aumento de cálcio citosólico secundário por aumentar a liberação de cálcio a partir de fontes intracelulares tais como retículo endoplasmático (via estimulação de receptores de trifosfato de inositol) e diminuir o clearance de cálcio devido à disfunção das bombas de Ca^{2+} -ATPase no retículo endoplasmático e membrana plasmática. A disfunção da bomba ATPase é dependente da hidrólise de EEAPO para o seu ácido graxo livre, o ácido palmitoleico (APO), que leva a um desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial, com consequente deficiência na produção de ATP e subsequente necrose celular (MINOTI et al., 2010).

Em vista das evidências que sugerem maior importância da lesão celular induzida por etanol à sua via não-oxidativa, resolvemos estudar o papel de ConA e ConBr no modelo de lesão celular induzida por ácido palmitoleico, um ácido graxo livre derivado da hidrólise de um etil éster de ácido graxo, que, como visto, tem mostrado grande relevância no mecanismo de dano celular promovido pelo etanol. Os resultados encontrados foram semelhantes com os achados anteriores do nosso trabalho, mostrando que ConA e ConBr foram capazes de prevenir a necrose induzida por ácido palmitoleico. As lectinas estudadas apresentam um mecanismo de proteção celular bastante eficaz, pois foram capazes de reduzir a necrose induzida por 3 modelos de lesão pancreática que culminam em necrose da célula acinar, um dos principais eventos destacados para o mau prognóstico no quadro clínico da pancreatite aguda. Corroborando com os nossos dados, um estudo realizado por Russi e colaboradores

(2012) demonstrou um efeito neuroprotetor de ConBr contra a morte de células hipocâmpais de camundongos induzida por ácido quinolínico, onde ConBr foi capaz de proteger as células da necrose causada por este agente. Além disso, foi demonstrado recentemente através do teste de viabilidade celular com MTT ((3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) que ConA e ConBr até a concentração de 200 µg/mL não induzem toxicidade em células normais, as quais foram utilizadas células mononucleares sanguíneas periféricas; contudo em linhagens de células leucêmicas ambas apresentaram potencial pró-apoptótico (FAHEINA-MARTINS et al., 2012), o que sugere uma seletividade de atuação de ConA e ConBr em células potencialmente lesionadas, descartando a possibilidade de agressão em células normais.

Lectinas são (glico) proteínas de origem não-imune que possuem pelo menos um domínio não catalítico, denominado domínio lectínico, através do qual se ligam de forma reversível e específica a carboidratos e substâncias que contêm açúcar (FAHEINA-MARTINS et al., 2012). A seletividade das lectinas por seus alvos naturais específicos dá-se em função de múltiplos sítios de ligação adicionais àqueles que determinam a especificidade, sendo denominados de sítios primários (ELGAVISH; SHAANAN, 1997). Esses sítios são os indicativos do tipo de oligossacáride ou carboidrato complexo que poderá ser reconhecido pela lectina. Portanto, lectinas específicas para manose se ligam em séries de carboidratos complexos portadores de resíduos de Manose, como o sacarídeo alfa-metil-manosídeo, por exemplo, ou Glicose terminais e lectinas específicas para a galactose vão se ligar em séries de oligossacárideos ou cadeias complexas de carboidratos que contenham resíduos terminais de galactose (ELGAVISH; SHAANAN, 1997).

Muitas das atividades biológicas das lectinas, em geral, estão relacionadas a essa interação com açúcares presentes nas superfícies celulares. Entretanto, lectinas podem apresentar outros sítios ligantes específicos para moléculas de natureza não glicídica (BARONDES, 1988). A comprovação da participação do domínio lectínico nos diferentes processos de reconhecimento e interação celular é possível pela inibição do efeito da lectina através da ligação da mesma ao seu açúcar/glicoconjugado específico, por modificação química dos carboidratos de superfície celular, ou pelo uso de células mutantes (NEVES et al., 2007). ConA e ConBr são lectinas com especificidades de ligação glicose/manose e têm mostrado atividades biológicas em diversos tipos de células (LI et al., 2011; CHATTERJEE; MANDAL, 2005; SILVA et al., 2009; BARBOSA et al., 2001), sendo essas atividades atribuídas muitas vezes ao seu domínio lectínico (DE FREITAS et al., 2013; ASSREUY et al., 2009; BURGESS et al., 2009).

Após confirmar o papel das lectinas reduzindo a morte celular necrótica em diferentes modelos de lesão em células acinares pancreáticas, buscou-se investigar se o domínio lectínico de ConA e ConBr teria participação nesse efeito protetor. Para tanto, ConA e ConBr foram incubadas durante 1h com α -metil-manosídeo, seu açúcar ligante específico; seguindo um protocolo que garante a ocupação do domínio lectínico pelo seu açúcar conjugado. Os resultados encontrados mostraram que o efeito anterior observado de proteção celular foi significativamente abolido, com o percentual de necrose dos grupos de lectinas incubadas com α -MM equiparando-se com o percentual necrosante dos respectivos agentes lesivos.

Para confirmar a especificidade do domínio lectínico de ConA e ConBr; em outra análise experimental, ambas foram previamente incubadas com D-galactose, um açúcar não ligante dessas lectinas. Os dados mostraram que o mesmo não inibiu o efeito antinecrótico produzido pela administração isolada de ConA e ConBr. Estes achados confirmam a afinidade dessas lectinas aos seus carboidratos específicos e indicam a estreita relação existente entre as suas ações anti-necróticas e o envolvimento do domínio lectínico, fortalecendo as informações obtidas na literatura que mostram inúmeras atividades biológicas de lectinas através da interação com outros sistemas via sítios de ligação a carboidratos (BREWER et al., 2002; SIMON; GREEN, 2005; PEUMANS; VAN DAMME, 1995).

Um estudo feito por Zhang et al (2003) mostrou que a elastase, uma serina-protease secretada pelo pâncreas exócrino durante o quadro de pancreatite aguda, é também uma proteína ligante de manose, tendo sido encontrada no suco pancreático de ratos e humanos, bem como na linhagem de células acinares de ratos (AR42J). Esse mesmo trabalho sugeriu que a propriedade de ligação à manose da elastase pancreática apresenta um papel na ativação de macrófagos e subsequente liberação de TNF- α , uma citocina pró-inflamatória crucial na resposta de fase aguda (ZHANG et al., 2003). Dessa forma, ConA e ConBr, sendo ambas ligantes de manose, poderiam competir pelo mesmo sítio de ligação da elastase, e por antagonismo competitivo impedir a ação desta última na ativação de macrófagos, contribuindo, possivelmente, em uma diminuição dos parâmetros inflamatórios envolvidos na pancreatite aguda.

O isotiocianato de fluoresceína (FITC) é um fluoróforo amplamente utilizado, devido à sua alta eficiência quântica e estabilidade quando conjugado. A conjugação ocorre através de grupos amina de proteínas ou peptídeos, formando uma ligação estável. Anticorpos, lectinas, hormônios e fatores de crescimento conjugados com FITC têm sido usados em uma variedade de aplicações em imunohistoquímica, citometria de fluxo e microscopia confocal (GOLIM et al., 2007). Lectinas com especificidades distintas têm sido conjugadas ao isotiocianato de

fluoresceína (FITC), com diversas finalidades, dentre elas: analisar a superfície de bactérias fixadoras de nitrogênio, avaliar a distribuição de receptores para lectinas em embriões de camundongos transplantados (KIMBER, 1989; DAM; BREWER, 2002), estudar glicoproteínas de superfície celular de espermatozoides de caprinos (SARKAR et al., 1991), identificação de células leucêmicas de origem mieloide e linfóide (FARIAS; CASTRO, 2004; BASSO et al., 2007), bem como observação de possíveis interações de lectinas com diversos tipos de células (CAVADA et al., 2001).

Dessa forma, ConA e ConBr conjugadas ao FITC foram administradas durante 1h às células acinares pancreáticas, com o propósito de observar a possível interação dessas lectinas junto às células. As imagens fluorescentes obtidas evidenciaram claramente uma interação a nível de membrana celular, pois a intensidade da fluorescência do FITC conjugado a ambas as lectinas se concentrou nas membranas dos ácinos pancreáticos. Essa observação se complementa com os dados, encontrados nesse estudo, de participação do domínio lectínico no efeito protetor de ConA e ConBr contra a necrose das células acinares pancreáticas, pois estes resultados em conjunto fortemente confirmam que a interação das lectinas com a membrana da célula acinar se dá através de ligações aos seus açúcares específicos que estão presentes na membrana dessas células.

Nossos resultados são consistentes com achados anteriores, onde foram detectados, através das técnicas de microscopia óptica e eletrônica, glicoconjugados no tecido pancreático e em células acinares pancreáticas isoladas (JONAS et al., 1991; JONAS; PUTZKE, 1992; WILLEMER et al., 1990). Outro trabalho com células acinares pancreáticas isoladas de ratos, realizado em citometria de fluxo, utilizou as lectinas fluoresceinadas Aglutinina de Gérmen de Trigo para demonstrar a presença dos açúcares N-acetil-D-glucosamina e ácido siálico; Aglutinina *Tetragonolobus purpureus* para demonstrar a presença de L-fucose e Concanavalina A para demonstrar a presença dos açúcares D-manose e D-glucose na membrana dessas células (PINTO et al., 2000). Dessa forma, com a confirmação da presença de açúcares na membrana das células acinares, e sendo ConA e ConBr ligantes específicas de açúcares conhecidos presentes nessas células, pode-se observar importância e o potencial biológico dessas moléculas nos processos fisiológicos e patológicos através de sua capacidade de mediar e codificar interações celulares (BREWER et al., 2002).

Estudos recentes indicam que o dano mitocondrial e depleção de ATP têm um papel central no desenvolvimento da pancreatite aguda (MALÉTH et al., 2013; MUKHERJEE et al., 2008; GUKOVSKY et al., 2011). Os fatores mais comuns, que induzem pancreatite aguda, tais como ácidos biliares e metabólitos não-oxidativos do etanol, promovem a

liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático e induzem influxo extracelular de Ca^{2+} . Este aumento sustentado na $[\text{Ca}^{2+}]_c$ leva a uma sobrecarga de Ca^{2+} mitocondrial e consequente diminuição de ATP. Por conta da importância do ATP para a atividade das bombas de Ca^{2+} -ATPase do retículo sarco-endoplasmático e Ca^{2+} -ATPase da membrana plasmática, que têm como principal função remover o Ca^{2+} do citoplasma; a diminuição de $(\text{ATP})_i$ pode fortemente contribuir para a manutenção de elevações sustentadas de Ca^{2+} . As elevações sustentadas de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ e o consequente dano mitocondrial desencadeiam um ciclo vicioso que, por sua vez, provoca necrose (VORONINA et al., 2002; FISCHER et al., 2007). Já foi demonstrado que o ácido taurolitocólico 3-sulfato (SATC) é capaz de induzir a liberação de Ca^{2+} do retículo endoplasmático em células acinares pancreáticas via ativação de receptores de trifosfato de inositol (IP_3R) e receptores de rianodina (RyR) (GERASIMENKO et al., 2006). Além disso, ácidos biliares mostraram também inibir a atividade da bomba Ca^{2+} -ATPase do retículo sarco-endoplasmático (KIM et al., 2002). Em outro estudo foi demonstrado que o SATC diminui $(\text{ATP})_i$ em células acinares pancreáticas (VORONINA et al., 2010) e ainda a administração de 100 μM de SATC induziu a perda do $\Delta\Psi_m$ (VORONINA et al., 2004).

Tendo em vista a grande importância do metabolismo mitocondrial no contexto da pancreatite aguda induzida por ácidos biliares, no presente trabalho buscou-se avaliar o papel de ConA e ConBr na manutenção da integridade da membrana mitocondrial no modelo de lesão celular induzido por SATC. Os resultados obtidos mostraram que a despolarização do $\Delta\Psi_m$ provocada por SATC foi significativamente revertida pelo pré-tratamento com ConA e ConBr. Dados estes que corroboram com os resultados do efeito anti-necrótico das mesmas na lesão celular induzida por este ácido biliar, sugerindo que o possível mecanismo de proteção celular destas lectinas neste modelo é devido, pelo menos em parte, ao seu papel na manutenção da integridade da membrana mitocondrial.

Estudos realizados em ratos têm mostrado que a exposição ao etanol inibe a apoptose no pâncreas exócrino, e que este efeito é devido à inibição da ativação de caspases (FORTUNATO et al., 2006; WANG et al., 2006). Nesse contexto, a inibição de caspases, por sua vez, exacerba a necrose e a gravidade do quadro de pancreatite (MARENINOVA et al., 2006). Tem sido fundamentada, através de uma série de experimentos realizados, a hipótese de que os efeitos do álcool nas respostas patológicas das células acinares são mediados pelos etil ésteres de ácidos graxos (EEAGs), os metabólitos da via não-oxidativa do etanol (CRIDDLE et al., 2006). Os EEAGs, de fato, são produzidos relativamente em grandes quantidades na célula acinar pancreática exposta ao etanol (GUKOVSKAYA et al., 2002).

EEAGs ligam-se e acumulam-se dentro da mitocôndria, onde hidrolases liberam localmente altas concentrações de ácidos graxos livres (LANGE; SOBEL, 1983). Estes podem, em última análise, resultar na abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial e perda do $\Delta\Psi_m$ (CRIDDLE et al., 2006). A perda do $\Delta\Psi_m$, por sua vez, inibe a liberação do citocromo *c* com consequente inibição da apoptose, que conhecidamente é uma via de morte celular sem consequências inflamatórias, além de comprometer a produção de ATP, levando à necrose celular (ODINOKOVA et al., 2008).

Outra proposta da presente pesquisa foi avaliar os efeitos de ConA e ConBr no metabolismo mitocondrial de células acinares pancreáticas expostas ao etanol, bem como ao seu metabólito não-oxidativo, o ácido palmitoleico. Os resultados obtidos foram uma proteção efetiva, promovida por ambas as lectinas, da função mitocondrial de células expostas ao etanol, onde foi observado que ConA e ConBr preveniram a despolarização desregulada de uma quantidade significativa de mitocôndrias quando comparado ao grupo de células expostas ao etanol.

Quando as células foram tratadas com APO foi observado que a despolarização mitocondrial promovida por este agente foi bastante exacerbada em comparação com os outros 2 modelos de lesão, chegando à quase totalidade das células com despolarização mitocondrial, esse fenômeno pode ser explicado com base na literatura que mostra evidências de que a cascata de processos que levam à disfunção mitocondrial e consequente necrose oriunda da exposição das células acinares ao etanol tem como principal evento desencadeante a sua via não-oxidativa (CRIDDLE et al., 2004, 2006, 2007).

Os resultados da pré-incubação das células acinares com as lectinas utilizadas nesse estudo mostraram que ConA preveniu significativamente a disfunção mitocondrial promovida por APO. A lectina ConBr mostrou uma tendência de redução da despolarização mitocondrial, contudo essa diminuição não chegou a ser significativa. A possível explicação para este evento reside no fato do processo de lesão mitocondrial promovida pelo APO ter sido de maneira muito intensa, já que alguns estudos mostram que metabólitos não-oxidativos do etanol podem ligar-se e acumular-se dentro da mitocôndria promovendo intensa lesão a esta organela (LANGE; SOBEL, 1983), e de alguma forma mesmo ConBr tendo prevenido significativamente a disfunção mitocondrial promovida pelo etanol, ela não foi capaz de reverter o processo de dano às mitocôndrias promovido pelo APO. Este resultado também mostra que apesar de ConA e ConBr apresentarem 99% de similaridade estrutural (FAHEINA-MARTINS et al., 2012), seus efeitos podem ser parecidos em algumas situações, mas diferirem em outras. Um estudo comparativo utilizando ambas as lectinas mostrou que

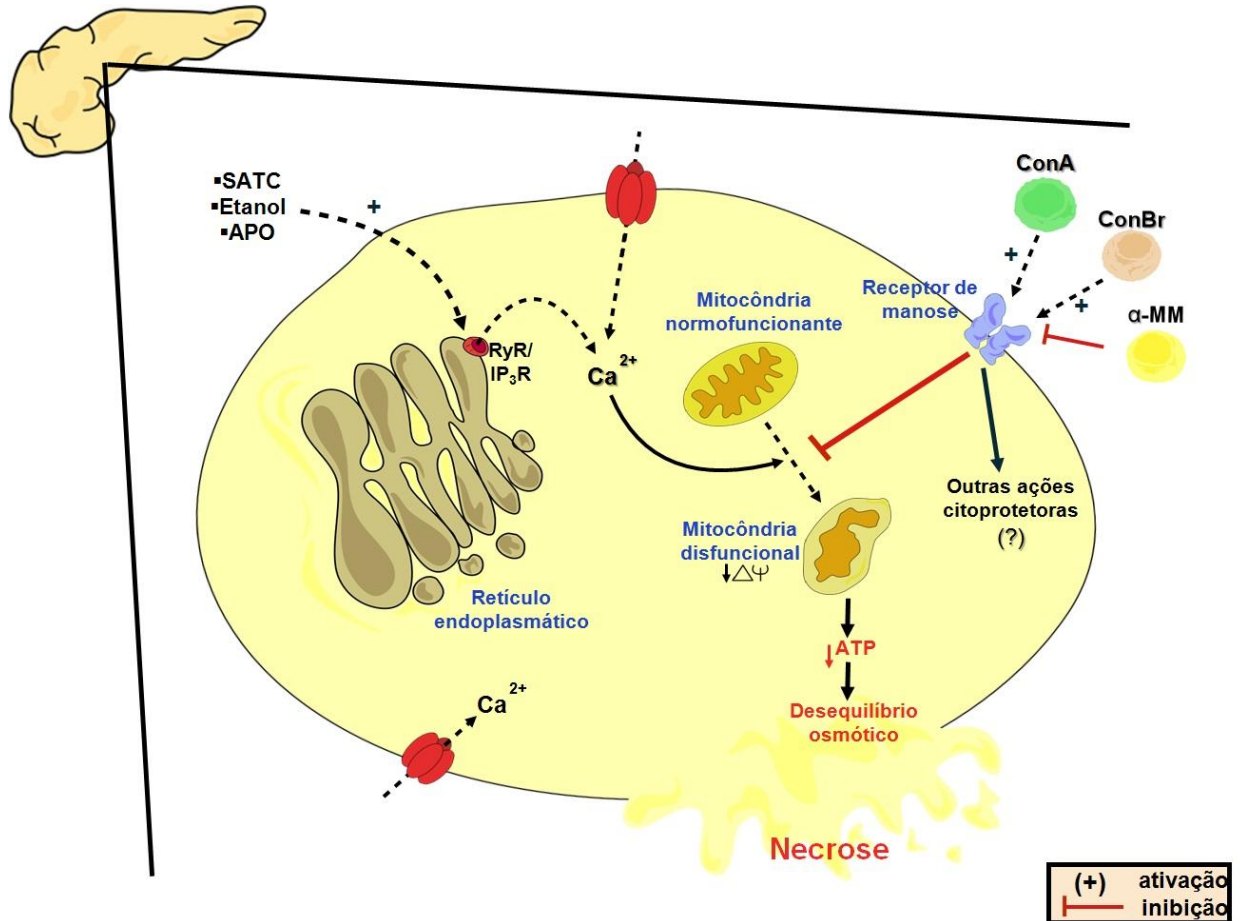
elas também agiram de maneira diferente, onde ConBr preveniu convulsões provocadas por ácido quinolínico em camundongos, contudo ConA não apresentou proteção significativa (RUSSI et al., 2012).

7. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que as lectinas ConA e ConBr ligam-se à membrana da célula acinar, promovendo significativa proteção contra a necrose de células acinares pancreáticas desencadeada pelos principais agentes envolvidos na pancreatite aguda, nomeadamente, ácido taurolitocólico sulfatado, etanol e ácido palmitoleico, sendo seus efeitos protetores mediados via domínio lectínico. A atividade anti-necrótica de ConA e ConBr também envolve como mecanismo importante, a manutenção da integridade da membrana mitocondrial.

MODELO HIPOTÉTICO

Figura 40. Efeito anti-necrótico das lectinas ConA e ConBr em células acinares pancreáticas no modelo de lesão celular induzida por ácido taurolitocólico sulfatado, etanol ou ácido palmitoleico (modelo hipotético).



As lectinas ConA e ConBr ligam-se à membrana da célula acinar pancreática através do seu domínio lectínico em receptores contendo resíduos de manose e por meio dessa interação promovem manutenção da integridade do potencial de membrana mitocondrial, impedindo o curso da necrose causada por ácido taurolitocólico 3-sulfato (SATC), etanol ou ácido palmitoleico (APO).

REFERÊNCIAS

- AFONSO-CARDOSO, S. R.; SILVA, C. V.; FERREIRA, M. S.; SOUZA, M. A. Effect of the *Synadeniumcarinatum* lectin (ScLL) on *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* infection in murine macrophages. **Exp Parasitol.**, v. 128, p. 61-67, 2011.
- AGRAWAL, B.B.L.; GOLDSTEIN, I.J. Specific binding of concanavalin A to cross-linked dextran gels. **Biochem J**, v. 96, n. 3, p. 23c–25c, 1965.
- AMBROSI, M.; CAMERON, N. R.; DAVIS, B. G. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. **Org Biomol Chem.**, v. 3, p. 1593-1608, 2005.
- AMMANN, R. W.; MUELLHAUPT, B. Progression of alcoholic acute to chronic pancreatitis. **Gut**, v. 35, n. 4, p. 552–556, 1994.
- AMSTERDAM, A.; JAMIESON, J. D. Studies on dispersed pancreatic exocrine cells. I. Dissociation technique and morphologic characteristics of separated cells. **J Cell Biol.**, v. 63, p. 1037-1056, 1974a.
- AMSTERDAM, A.; JAMIESON, J. D. Studies on dispersed pancreatic exocrine cells. II. Functional characteristics of separated cells. **J Cell Biol.**, v. 63, p. 1057-1073, 1974b.
- ANAND, N.; PARK, J.; WU, B. Modern Management of acute pancreatitis. **Gastroenterol Clin North Am.**, v. 41, p. 1-8, 2012.
- ANDRADE, J. L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M. V.; CAVADA, B. S.; BARRAL-NETTO, M. Lectin-induced nitric oxide production. **Cell Immunol.**, v. 194, p.98-102, 1999.
- APTE, M. V.; PIROLA, R. C.; WILSON, J. S. Mechanisms of alcoholic pancreatitis. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 25, n. 12, p. 1816–1826, 2010.
- ASSREUY, A. M.; FONTENELE, S. R.; PIRES, A. D. E. F.; FERNANDES, D. C.; RODRIGUES, N. V.; BEZERRA, E. H.; MOURA, T. R.; DO NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S. Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the *Canavalia* genus. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol**, v. 380, n. 6, p. 509–521, 2009.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug Discovery from Medicinal Plants. **Life Sci.**, v. 78, p. 431-441, 2005.
- BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B.; GRANGEIRO, T. B.; DE FREITAS, L. A.; BARRAL-NETTO, M. *In vivo* lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the *Diocleinae* subtribe. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 673–678, 2001.
- BARONDES, S.H. Biofunctional properties of lectins: lectins redefined. **Trends Biochem Sci.**, v. 13, p. 480-482, 1988.
- BARRAL-NETTO, M.; SANTOS, S. B.; BARRAL, A.; MOREIRA, L. I. M.; SANTOS, C. F.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T.; CAVADA, B. S. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the *Diocleae* tribe. **Immunol Invest**, v. 21, n. 4, p. 297–303, 1992.

BASSO, G.; CASE, C.; DELL'ORTO, M. C. Diagnosis and genetic subtypes of leukemia combining gene expression and flow cytometry. **Bood Cells, Molecules and Diseases**, v. 39, p. 164-168, 2007.

BECKNGHAM, J.; BORNMAN, P. C. ABC of diseases of liver, pancreas, and biliary system. acute pancreatitis. **BMJ**, v. 322, n. 7286, p. 595–598, 2001.

BEGER, H. G.; RAU, B. M. Severe acute pancreatitis: clinical course and management. **World J Gastroenterol.**, v. 13, p. 5043-5051, 2007.

BEZERRA, E. H.; ROCHA, B. A.; NAGANO, C. S.; BEZERRA, G. A.; MOURA, T. R.; BEZERRA, M. J.; BENEVIDES, R. G.; SAMPAIO, A. H.; ASSREUY, A. M.; DELATORRE, P.; CAVADA, B. S. Structural analysis of ConBr reveals molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and endothelial NO synthase activation. **BiochemBiophys Res Commun.**, v. 408, p. 566-570, 2011.

BHARDWAJ, P.; GARG, P. K.; MAULIK, S. K.; SARAYA, A.; TANDON, R. K.; ACHARYA, S. K. A randomized controlled trial of antioxidant supplementation for pain relief in patients with chronic pancreatitis. **Gastroenterology**, v. 136, p. 149-159, 2009.

BHATIA, M. “Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis” **Am J PhysiolGastrointest Liver Physiol.**, v. 286, p. G189-G196, 2004.

BHATIA, M.; BRADY, M.; SHOKUHI, S.; CHRISTMAS, S.; NEOPTOLEMOS, J. P.; SLAVIN, J. Inflammatory mediators in acute pancreatitis. **J Pathol**, v. 190, p. 117-125, 2000.

BHATIA, M.; WONG, F. L.; CAO, Y.; LAU, H. Y.; HUANG, J.; PUNEET, P.; CHEVALI, L. Pathophysiology of acute pancreatitis. **Pancreatology**, v. 5, p. 132-144, 2005

BOLLEN, T. L.; BESSELINK, M. G. H.; VAN SANTVOORT, H. C.; GOOSZEN, H. G.; VAN LEEUWEN, M. S. Toward an update of the Atlanta classification on acute pancreatitis: review of new and abandoned terms. **Pancreas**, v. 35, p. 107-113, 2007.

BOOTH, D. M.; MURPHY, J. A.; MUKHERJEE, R.; AWAIS, M.; NEOPTOLEMOS, J. P.; GERASIMENKO, O. V.; TEPIKIN, A. V.; PETERSEN, O. H.; SUTTON, R.; CRIDDLE, D. N. Reactive Oxygen Species Induced by Bile Acid Induce Apoptosis and Protect Against Necrosis in Pancreatic Acinar Cells. **Gastroenterology**, v. 140, p. 2116-2125, 2011.

BOTOS, I.; WLODAWER, A. Proteins that bind high-mannose sugars of the HIV envelope. **Prog Biophys Mol Biol**, v. 88, n. 2, p. 233–282, 2005.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. DATASUS. (2007) Informações de saúde - 2006 [acesso em 2014 out 25]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sih/cnv/mrbr.def>

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Informações em Saúde - 2011 [acesso em 2014 out 25]. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sih/cnv/niuf.def>>.

BRASIL. SERVIÇO FLORESTAL BRASILEIRO. **Florestas do Brasil em Resumo - 2013: dados de 2007-2012.** – Brasília: SFB, 2013.

BREWER, C.F.; MICELI, M.C.; BAUM, L.G. Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions. **Curr Opin Struct Biol**, v. 12, n. 5, p. 616–623, 2002.

BRINDA, K. V.; MITRA, N.; SUROLIA, A.; VISHVESHWARA, S. Determinants of quaternary association in legume lectins. **Protein Sci**, v. 13, n. 7, p. 1735–1749, 2004.

BRÖKER, L. E.; KRUYT, F. A. E.; GIACCONE, G. Cell Death Independent of Caspases: A Review. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 9, p. 3155-3162, 2005.

BURGESS, A.; MORNON, J. P.; DE SAINT-BASILE, G.; CALLEBAUT, I. A concanavalin A-like lectin domain in the CHS1/LYST protein, shared by members of the BEACH family. **Bioinformatics**, v. 25, n. 10, p. 1219–1222, 2009.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **J Ethnopharmacol.**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CARRINGTON, D.M.; AUFFRET, A.; HANKE, D.A. Polypeptide ligation occurs during post-translational modification of concanavalin A. **Nature**, v. 313, n. 5597, p. 64–67, 1985.

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

CAVADA, B. S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T. B.; BARRAL-NETTO, M. Revisiting proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the *Diocleinae* subtribe lectins. **Curr Protein Pept Sci.**, v. 2, p. 123-135, 2001.

CAVALCANTE, T. T. A.; da ROCHA, B. A. M.; CARNEIRO, V. A.; ARRUDA, F. V. S.; do NASCIMENTO, A. S. F.; SÁ, N. C.; do NASCIMENTO, K. S.; CAVADA B. S.; TEIXEIRA, E. H.; Effect of lectins from *Diocleinae subtribe* against oral Streptococci. **Molecules**, v. 16, n. 5, p. 3530–3543, 2011.

CHAN, Y. C.; LEUNG, P. S. Acute pancreatitis: models, markers, and mediators. **Shock** v. 24, p. S45-S51, 2005.

CHANG, C. P.; YANG, M. C.; LIU, H. S.; LIN, Y. S.; LEI, H. Y. Concanavalin A induces autophagy in hepatoma cells and has a therapeutic effect in a murine in situ hepatoma model. **Hepatology**, v. 45, n. 2, p. 286-296, 2007.

CHATTERJEE, A.; MANDAL, D. K. Quaternary association and reactivation of dimeric concanavalin A. **Int J BiolMacromol.**, v.35, p.103-109, 2005.

CHOWDHURY, P.; GUPTA, P.; Pathophysiology of alcoholic pancreatitis: An overview. **World J Gastroenterol.**, v. 12, p.7421-7427, 2006.

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

COELHO, L. C. B. B.; SILVA, M. B. R. Simple method to purify milligram quantities of the galactose-specific lectin from the leaves of *Bauhinia monandra*. **Phytochem Anal**, v. 11, n. 5, p. 295–300, 2000.

CORGIER, C. Lestumeursdupancréasendocrine chez lescarnivoresdoméstiques: Étudebibliographique. 2002. Tese (Doutorado em Veterinária) -ÉcoleNationaleVétérinaire de Lyon, 2002.

CRIDDLE, D. N.; GERASIMENKO, J. V.; BAUMGARTNER, H. K.; JAFFAR, M.; VORONINA, S.; SUTTON, R.; PETERSEN, O. H.; GERASIMENKO, O. V. Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis? **Cell Death Differ.**, v. 14, p. 1285–1294, 2007.

CRIDDLE, D. N.; GILLIES, S.; BAUMGARTNER-WILSON, H. K.; JAFFAR, M.; CHINJE, E. C.; PASSMORE, S.; CHVANOV, M.; BARROW, S.; GERASIMENKO, O. V.; TEPIKIN, A. V.; SUTTON, R.; PETERSEN, O. H. Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells. **J Biol Chem.**, v. 281, p. 40485–40492, 2006.

CRIDDLE, D. N.; MURPHY, J.; FISTETTO, G.; BARROW, S.; TEPIKIN, A. V.; NEOPTOLEMOS, J. P.; SUTTON, R.; PETERSEN, O. H. Fatty acid ethyl esters cause pancreatic calcium toxicity via inositol trisphosphate receptors and loss of ATP synthesis. **Gastroenterology**, v. 130, n. 3, p.781–793, 2006.

CRIDDLE, D. N.; RARATY, M. G. T.; NEOPTOLEMOS, J. P.; TEPIKIN, A. V.; PETERSEN, O. H.; SUTTON, R. Ethanol toxicity in pancreatic acinar cells: Mediation by nonoxidative fatty acid metabolites. **PNAS** v. 10, p. 10738–10743, 2004.

CRIDDLE, D.N.; GERASIMENKO, J.V.; BAUMGARTNER, H.K.; JAFFAR, M.; VORONINA, S.; SUTTON, R.; PETERSEN, O. H.; GERASIMENKO,O.V. Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis? **Cell Death Differ**,v. 14, n. 7, p. 1285–1294, 2007.

CRIDDLE, D.N.; RARATY, M.G.; NEOPTOLEMOS, J.P.; TEPIKIN, A.V.; PETERSEN, O.H.; SUTTON, R. Ethanol toxicity in pancreatic acinar cells: mediation by nonoxidative fatty acid metabolites. **Proc Natl Acad Sci USA**,v. 101, n. 29, p. 10738–10743, 2004.

CULLEN, J. M.; MACLACHLAN, N. J. Liver, biliary system and exocrine pancreas. In: CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. **Thomson's special veterinary pathology**. 3. ed. Mosby, 2001. 81-124 p.

DAM, T. K.; BREWER, C. F. Thermodynamics studies of lectin-carbohydrate interactions by isothermal titration calorimetry. **Chem Rev.**, v. 102, p. 387–429, 2002.

DE CAMPOS, T.; BRAGA, C. F.; KURYURA, L.; HEBARA, D.; ASSEF, J. C.; RASSLAN, S. Changes in the management of patients with severe acute pancreatitis. **ArqGastroenterol.**, v. 45, p. 181-185, 2008.

DE CAMPOS, T.; PARREIRA, J. G.; UTIYAMA, E.; RASSLAN, S. Pesquisa nacional sobre condutas na pancreatite aguda. **Rev Col Bras Cir.**, v. 35, p. 304-310. 2008.

DE FREITAS PIRES, A.; ASSREUY, A. M.; LOPES, É. A.; CELEDÔNIO, N. R.; SOARES, C. E.; RODRIGUES, N. V.; SOUSA, P. L.; BENEVIDES, R. G.; NAGANO, C. S.; CAVADA, B. S.; LEAL-CARDOSO, J. H.; COELHO-DE-SOUZA, A. N.; SANTOS, C. F. Opioid-like antinociceptive effects of oral administration of a lectin purified from the seeds of *Canavalia brasiliensis*. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 27, n.2, p. 201–209, 2013.

DE MEJÍA, E. G.; PRISECARU, V. I. Lectins as bioactive plant proteins: a potential in cancer treatment. **Crit Rev Food Sci.**, v. 45, p. 425-445, 2005.

DELATORRE, P.; ROCHA, B. A.; SOUZA, E. P.; OLIVEIRA, T. M.; BEZERRA, G. A.; MORENO, F. B.; FREITAS, B. T.; SANTI-GADELHA, T.; SAMPAIO, A. H.; AZEVEDO, W. F. JR.; CAVADA, B. S. Structure of a lectin from *Canavalia gladiata* seeds: new structural insights for old molecules. **BMC Struct Biol**, v. 7, p. 52, 2007.

DEVARAJAN, P. V.; SONAVANE, G. S. Lectin mediated drug delivery systems, 2003. Disponível em <<http://www.expresspharmapulse.com>>. Acesso em: 20 dez. 2014.

DHUNA, V.; BAINS, J. S.; KAMBOJ, S. S.; SINGH, J.; KAMBOJ, S.; SAXENA, A. K. Purification and characterization of a lectin from *Arisaematortuosum* Schott having in vitro anticancer activity against human cancer cell lines. **J BiochemMol Biol.**, v. 38, p. 526-532, 2005.

DRYDEN, G. W.; DEACUIC, I.; ARTEEL, G.; MCCLAIN, C. J. Clinical implications of oxidative stress and antioxidant therapy. **Curr Gastroenterol Rev**, v. 7, n. 4, p. 308–316, 2005.

EDELMAN, G.M.; CUNNINGHAM, B.A.; REEKE, G.N. JR.; BECKER, J.W.; WAXDAL, M.J.; WANG, J.L. The covalent and three-dimensional structure of concanavalin A. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 69, n. 9, p. 2580–2584, 1972.

ESTAQUIER, J.; VALLETTE, F.; VAYSSIERE, J. L.; MIGNOTTE, B. “The mitochondrial pathways of apoptosis” **Adv Exp Med Biol.**, v. 942, p. 157-183, 2012.

FAHEINA-MARTINS, G. V.; DA SILVEIRA, A. L.; CAVALCANTI, B. C.; RAMOS, M. V.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; ARAÚJO, D. A. M. Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. **Toxicol In Vitro.**, v. 26, p. 1161-1169, 2012.

FAHEINA-MARTINS, G. V.; DA SILVEIRA, A. L.; RAMOS, M. V.; MARQUES-SANTOS, L. F.; ARAUJO, D. A. Influence of fetal bovine serum on cytotoxic and genotoxic effects of lectins in MCF-7 cells. **J Biochem Mol Toxicol.**, v. 25, p. 290-296, 2011.

FARIAS, M. G.; CASTRO, S. M. Diagnóstico Laboratorial das leucemias linfóides agudas. **J Bras Patol Med Lab.**, v. 40, p. 91-98, 2004.

FAY, A. M.; BOWIE, D. Concanavalin-A reports agonist-induced conformational 43 changes in the intact GluR6 kainate receptor. **J Physiol.**, v. 572, p. 201-44 213, 2006.

FELDERBAUER, P.; MULLER, C.; BULUT, K.; BELYAEV, O.; SCHMITZ, F.; UHL, W.; SCHMIDT, W. E. Pathophysiology and treatment of acute pancreatitis: new therapeutic targets-a ray of hope? **Basic ClinPharmacolToxicol.**,v. 97, p. 342-350, 2005.

FELDMAN, M.; FRIEDMAN, L.; BRANDT, L. **Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease**. 9. ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2010.

FOLCH, E.; PRATS, N.; HOTTER, G.; LOPEZ, S.; GELPI, E.; ROSELLO-CATAFAU, J.; CLOSA, D. P-selectin expression and Kupffercell activation in rat acute pancreatitis. **Dig Dis Sci.**,v. 45, p. 1535-1544, 2000.

FORTUNATO, F.; DENG, X.; GATES, L. K.; MCCLAIN, C. J.; BIMMLER, D.; GRAF, R.; WHITCOMB, D. C. Pancreatic response to endotoxin after chronic alcohol exposure: switch from apoptosis to necrosis? **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**,v. 290, n. 2, p. 232–241, 2006.

FREITAS, C. D. T.; RAMOS, M. V.; SOUZA, D. P.; MARINHO-FILHO, J. D. B.; TEIXEIRA, F. M.; OLIVEIRA, J. S. Correlações entre atividade inseticida e resistência a proteólise de duas lectinas vegetais glicose/manose. **Com Sci**, v. 2, n. 1, p. 34–41, 2011.

FROSSARD, J. L.; STEER, M. L.; PASTOR, C. M. Acute pancreatitis. **Lancet.**, v. 371, p. 143-152, 2008.

FRULLONI, L. et al. Italian consensus guidelines for chronic pancreatitis. **Dig Liver Dis.**, v. 42 Suppl 6, p. S381-S406, 2010.

GALLAGHER, S. F.; YANG, J.; BAKSH, K.; HAINES, K.; CARPENTER, H.; EPLING-BURNETTE, P. K.; PENG, Y.; NORMAN, J.; MURR, M. M. Acute pancreatitis induces FasL gene expression and apoptosis in the liver. **J Surg Res.**,v. 122, p. 201-209, 2004.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. G.; VAN DEN BERG, C. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, p. 52-61, 2005.

GOLDSTEIN, I. J. Studies on the combining sites of concanavalin A. **Adv Exp Med Biol**, v.55, p. 35–53, 1975.

GOLDSTEIN, I.J.; HUGHES, R.C.; MONSIGNY, M.; OZAWA, T.; SHARON, N. Whatshould be called a lectin? **Nature**, v. 285, n. 66, p.60, 1980.

GOLIM, M. A.; DEFFUNE, E.; ROSSI-FERREIRA, R.; OLIVEIRA, A.P.E.; PADOVANI, C.R.; MACHADO, P.E.A. Conjugation and validation of IgG 1-FITC isotype control to be used in flow cytometry. **Rev Bras Hematol Hemoter**,v. 29, n. 4, p. 361–368, 2007.

GOMES, J. C.; ROSSI, R. R.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans, comparisom with concanavalina A. **Agents Actions**, v. 41, n. 3–4, p. 132–135,1994.

GRANGEIRO, T. B.; SCHRIEFER, A.; CALVETE, J. J. RAID, M.; URBANKE, C.; BARRAL-NETTO, M.; CAVADA, B. S. Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. **Eur J Biochem**, v. 248, n. 1, p. 43–48, 1997.

GUEDES, R.S; QUIRINO, Z. G. M., GONÇALVES, E. P. Fenologia reprodutiva e biologia da polinização de *Canavalia brasiliensis* Mart. ex Benth (Fabaceae). **Biotemas**, v. 22, n. 1, p. 27–37, 2009.

GUKOVSKAYA, A. S.; MOURIA, M.; GUKOVSKY, I.; REYES, C. N.; KASHO, V. N.; FALLER, L. D.; PANDOL, S. J. Ethanol metabolism and transcription factor activation in pancreatic acinar cells in rats. **Gastroenterology**, v. 122, n. 1, p. 106–118, 2002.

GUKOVSKAYA, A. S.; MOURIA, M.; GUKOVSKY, I.; REYES, C. N.; KASHO, V. N.; FALLER, L. D.; PANDOL, S. J. Ethanol metabolism and transcription factor activation in pancreatic acinar cells in rats. **Gastroenterology**, v. 122, n. 1, p. 106–118, 2002.

HABER, P. S.; APTE, M. V.; APPLGATE, T. L.; NORTON, I. D.; KORSTEN, M. A.; PIROLA, R. C.; WILSON, J. S. Metabolism of ethanol by rat pancreatic acinar cells. **J Lab Clin Med**, v. 132, n. 4, p. 294–302, 1998.

HABER, P. S.; APTE, M. V.; MORAN, C.; APPLGATE, T. L.; PIROLA, R. C.; KORSTEN, M. A.; MCCAUGHAN, G. W.; WILSON, J. S. Non-oxidative metabolism of ethanol by rat pancreatic acini. **Pancreatology**, v. 4, n. 2, p. 82–89, 2004.

HAJJAR, N. A.; IANCU, C.; BODEA, R. Modern therapeutic approach of acute severe forms of pancreatitis. A review of the literature and experience of Surgical Department No III Cluj. **Chirurgia (Bucur)**, v. 107, p. 605–10, 2012.

HALANGK, W.; LERCH, M. M. A unique pancreatic mitochondrial response to calcium and its role in apoptosis. **Gut**, v. 58, n. 3, p. 328–330, 2009.

HARDMAN, K.D.; AGARWAL, R.C.; FREISER, M.J. Manganese and calcium binding sites of concalectin A. **J. Mol. Biol**, v. 157, n. 1, p. 69–86, 1982.

HARDMAN, K.D.; AINSWORTH, C.F. Structure of concalectin A at 2.4-Å resolution. **Biochemistry**, v. 11, n. 26, p. 4910–4919, 1972.

HEGYI, P.; PANDOL, S.; VENGLOVECS, V.; RAKONCZAY, Z. JR. The acinar-ductal tango in the pathogenesis of acute pancreatitis. **Gut**, v. 60, p. 544–552, 2011.

HEIDT D, MULHOLLAND M, SIMONE D. **Pancreas: anatomy and structural anomalies**. **Textbook of Gastroenterology**. 5. ed. Edited by Tadataka Yamada, 2009. 1747–1754 p.

HERDT, H. Gastrointestinal Physiology and Metabolism . In: CUNNINGHAM, J. G.; KLEIN B. G. **Textbook of veterinary physiology**. 4. ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2007. 436–441 p.

HIROTA, M.; OHMURAYA, M.; BABA, H. The role of trypsin, trypsin inhibitor and trypsin receptor in the onset and aggravation of pancreatitis. **J Gastroenterol.**, v. 41, p. 832-836, 2006.

HUANG, W.; BOOTH, D. W.; CANE, M. C.; CHVANOV, M.; JAVED, M. A.; ELLIOTT, V. L.; ARMSTRONG, J. A.; DINGS DALE, H.; CASH, N.; LI, Y.; GREENHALF, W.; MUKHERJEE, R.; KAPHALIA, B. S.; JAFFAR, M.; PETERSEN, O. H.; TEPIKIN, A. V.; SUTTON, R.; CRIDDLE, D. N. Fatty acid ethyl ester synthase inhibition ameliorates ethanol-induced Ca^{2+} -dependent mitochondrial dysfunction and acute pancreatitis. **Gut**, v. 63, p. 1313-1324, 2014.

HUNGUND, B. L.; GOLDSTEIN, D. B.; VILLEGAS, F.; COOPER, T. B. Formation of fatty acid ethyl esters during chronic ethanol treatment in mice. **Biochem Pharmacol**, v. 37, n. 15, p. 3001-3004, 1988.

INA, C.; SANO, K.; YAMAMOTO-TAKAHASHI, M.; MATSUSHITA-OIAWA, H.; TAKEKAWA, H.; TAKEHARA, Y.; UEDA, H.; OQAWA, H. Screening for and purification of novel self-aggregatable lectins reveal a new functional lectin group in the bark of leguminous trees. **Biochim Biophys Acta**, v. 1726, n. 1, p. 21-27, 2005.

JACQUES, A. V.; RIEGER, D. K.; MAESTRI, M.; LOPES, M. W.; PERES, T. V.; GONÇALVES, F. M.; PEDRO, D. Z.; TASCA, C. I.; LÓPEZ, M. G.; EGEA, J.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; LEAL, R. B. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity in a manner dependent of PI3K/Akt pathway. **Neurochem Int**, v. 62, n. 6, p. 836-842, 2013.

JAIN, D.; KAUR, K. J.; GOEL, M.; SALUNKE, D. M. Structural basis of functional mimicry between carbohydrate and peptide ligands of con A. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 272, p. 843-849, 2000.

JONAS, L.; OSTWALD, C.; GRIETHE, W.; LETKO, G. Light and electron microscopic studies of lectin binding on the glycocalix of rat pancreatic cells. I. Normal tissue and isolated cells. **Acta Histochem.**, v. 91, p. 213-224, 1991.

JONAS, L., PUTZKE, H. Light and electron microscopic studies of lectin binding. Glycocalix of rat pancreatic cells. II. Light microscopic changes after induction of an oil-olive pancreatitis. **Acta Histochem.**, v. 93, p. 388-396, 1992.

JONES, D.B.; JOHNS, C.O. Some Proteins from the Jack Bean, *Canavalia Ensiformis*. **J Biol Chem**, v. 28, p. 67-75, 1916.

KHOKHAR, A. S.; SEIDNER, D. L. The pathophysiology of pancreatitis. **Nutr Clin Pract.**, v. 19, p. 5-15, 2004.

KILPATRICK, D. C. Animal lectins: a historical introduction and overview. **Biochim Biophys Acta**, v. 1572, p. 187-197, 2002.

KIM, J. Y.; KIM, K. H.; LEE, J. A.; NAMKUNG, W.; SUN, A. Q.; ANANTHANARAYANAN, M.; SUCHY, F. J.; SHIN, D. M. Transporter-mediated bile acid

uptake causes Ca^{2+} -dependent cell death in rat pancreatic acinar cells. **Gastroenterology**, v. 122, p. 1941-53, 2002.

KIMBER, S. J. Changes in cell-surface glycoconjugates during embryonic development demonstrated using lectins and other probes. **BiochemSoc Trans.**, v. 17, p. 23-7, 1989.

KLEIN, L. C. Jr.; GANDOLFI, R. B.; SANTIN, J. R.; LEMOS, M.; CECHINEL FILHO, V.; ANDRADE, S. F. Antiulcerogenic activity of extract, fractions, and some compounds obtained from *Polygala cyparissias* St. Hillaire&Moquin (Poligalaceae). **NaunynSchmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 381, p. 121-126, 2010.

KRUGER, B.; ALBRECHT, E.; LERCH, M. M. The role of intracellular calcium signaling in premature protease activation and the onset of pancreatitis. **Am J Pathol.**, v. 157, p. 43-50. 2000.

KULKARNI, G. V.; MCCULLOCH, C. A. Concanavalin A induced apoptosis in fibroblasts: the role of cell surface carbohydrates in lectin mediated cytotoxicity. **J Cell Physiol.**, v. 165, p. 119-133, 1995.

KULKARNI, G.V.; LEE, W.; SETH, A.; MCCULLOCH, C. A. Role of mitochondrial membrane potential in concanavalin a-induced apoptosis in human fibroblasts. **Exp Cell Res.**, v. 245, p. 170-178, 1998.

LANGE, L. G. Nonoxidative ethanol metabolism: formation of fatty acid ethyl esters by cholesterol esterase. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 79, n. 13, p. 3954–3957, 1982.

LANGE, L. G.; SOBEL, B. E. Mitochondrial dysfunction induced by fatty acid ethyl esters, myocardial metabolites of ethanol. **J Clin Invest**, v. 72, n. 2, p. 724–731, 1983.

LATHA, V. L.; RAO, R. N.; NADIMPALLI, S. K. Affinity purification, physicochemical and immunological characterization of a galactose-specific lectin from the seeds of *Dolichos lablab* (Indian lablab beans). **Protein Expr Purif**, v. 45, n. 2, p. 296–306, 2006.

LEI, H-Y.; CHANG, C-P. Lectin of Concanavalin A as an anti-hepatoma therapeutic agent. **Journal of Biomedical Science**, v. 16, p. 10, 2009.

LEUNG, P. S. Physiology of the pancreas. In: **The Renin-Angiotensin System: Current Research Progress in the Pancreas**. Netherlands: Springer, 2010. 13-27 p.

LEUNG, P. S.; IP, S. P. Pancreatic acinar cell: its role in acute pancreatitis. **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 38, p. 1024-30, 2006.

LI, C. Y.; XU, H. L.; LIU, B.; BAO, J. K. Concanavalin A, from an old protein to novel candidate anti-neoplastic drug. **CurrMolPharmacol.**, v. 3, p. 123-128. 2010.

LI, W. W.; YU, J. Y.; XU, H. L.; BAO, J. K. Concanavalin A: a potential anti-neoplastic agent targeting apoptosis, autophagy and anti-angiogenesis for cancer therapeutics. **BiochemBiophys Res Commun.**, v. 414, p. 282-286, 2011.

LIEBER CS. Metabolism of ethanol. In: Lieber CS, ed. *Medical and Nutritional Complications of Alcoholism: Mechanisms and Management*. New York: Plenum Publishing Corporation, 1992;1–35.

LIU, B.; BIAN, H. J.; BAO, J. K. Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic, **Cancer Lett**, v. 287, n. 1, p. 1–12, 2010.

LIU, B.; LI, C. Y.; BIAN, H. J.; MIN, M. W.; CHEN, L. F.; BAO, J. K. Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells. **Arch Biochem Biophys**, v. 482, p.1-6, 2009.

LIU, H. B.; CUI, N. Q.; LI, D. H.; CHEN, C. Role of Kupffer cells in acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis-associated lung injury of rats. **World J Gastroenterol.**, v. 12, p. 403-407, 2006.

LIU, Z.; LUO, Y.; ZHOU, T. T.; ZHANG, W. Z. Could plant lectins become promising anti-tumour drugs for causing autophagic cell death? **Cell Prolif**, v. 46, n. 5, p. 509–515, 2013.

LONGO, D.; FAUCI, A.; KASPER, D.; HAUSER, S.; JAMESON, J.; LOSCALZO, J. **Harrison's Principles of Internal Medicine**. 18. ed. New York: McGraw-Hill, 2011. 2635-2638 p.

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

LUGEA, A.; GUKOVSKY, I.; GUKOVSKAYA, A. S.; PANDOL, S. J. Nonoxidative ethanol metabolites alter extracellular matrix protein content in rat pancreas. **Gastroenterology**, v. 125, n. 6, p. 1845–1859, 2003.

MALÉTH, J.; RAKONCZAY JR, Z.; VENGLOVECZ, V.; DOLMAN, N. J.; HEGY, P. Central role of mitochondrial injury in the pathogenesis of acute pancreatitis. **Acta Physiol.**, v. 207, p. 226–235, 2013.

MANOJ, N.; SUGUNA, K. Signature of quaternary structure in the sequences of legume lectins. **Protein Eng**, v. 14, n. 10, p. 735–745, 2001.

MARENINOVA, O. A.; SUNG, K. F.; HONG, P.; LUGEA, A.; PANDOL, S. J.; GUKOVSKY, I.; GUKOVSKAYA, A. S. “Cell death in pancreatitis: caspases protect from necrotizing pancreatitis” **J Biol Chem.**, v. 281, p. 3370-3381, 2006.

MAYERLE, J.; SCHNEKENBURGER, J.; KRÜGER, B.; KELLERMANN, J.; RUTHENBÜRGER, M.; WEISS, F. U.; NALLI, A.; DOMSCHKE, W.; LERCH, M. M. Extracellular cleavage of E-cadherin by leukocyte elastase during acute experimental pancreatitis in rats. **Gastroenterology**, v. 129, n. 4, p. 1251–1267, 2005.

MELINO, G.; KNIGHT, R. A.; NICOTERA, P. How many ways to die? How many different models of cell death? **Cell Death Differ.**, v. 12, p. S1457-1462, 2005.

MESQUITA, R. O.; ARAGÃO, K. S.; BITENCOURT, F.S.; SILVESTRE, P. P.; VASCONCELOS, M. P.; NASCIMENTO, K. S.; BENEVIDES, R. G.; VALE, M. R.; CAVADA, B. S.; ALENCAR, N. M. N. Lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) reduz a glicemia em ratos diabéticos. Anais da 57^a Reunião Anual da SBPC - Fortaleza, CE - Julho/2005.

MISLOVICOVA, D.; GEMEINER, P.; KOZAROVA, A.; KOZAR, T. Lectinomics I. Relevance of exogenous plant lectins in biomedical diagnostics. **Biologia**, v. 64, n. 1, p. 1-2, 2009.

MOORE, K. L.; DALLEY, A. F. **Anatomia orientada para a clínica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2007. 180 p.

MOREIRA, R. A.; AINOUIZ, I. L. Purification of a lectin from jackfruit (*Artocarpus integrifolia* L) seeds. **Plant Physiol**, 1978.

MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S. Lectin from *Canavaliabrasiliensis*: Isolation, characterization and behavior during germination. **BiolPlantarum**, v. 26, p. 113-120, 1984.

MOREIRA, R.A.; CASTELO-BRANCO, C.C.; MONTEIRO, A.C.O.; TAVARES, R. O.; BELTRAMINI, L.M. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpusincisa* L. Seeds. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1183–1188, 1998.

MOURA, T. R.; BEZERRA, G. A.; BEZERRA, M. J.; TEIXERA, C. S.; BEZERRA, E. H.; BENEVIDES, R. G.; DA ROCHA, B. A.; DE SOUZA, L. A.; DELATORRE, P.; NAGANO, C. S.; CAVADA, B. S. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the lectin from *Canavaliaboliviana* Piper seeds. **ActaCrystallogr Sect F StructBiolCrystCommun.**, v. 65, p. 213-215, 2009.

MUALLEM, S.; KWIATKOWSKA, K.; XU, X.; YIN, H. L. Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells. **J Cell Biol.**, v. 128, p. 589-598, 1995.

MURPHY, J. A.; CRIDDLE, D. N.; SHERWOOD, M.;CHVANOV, M.; MUKHERJEE, R.; MCLAUGHLIN, E.; BOOTH, D.; GERASIMENKO, J. V.; RARATY, M. G.; GHANEH, P.;NEOPTOLEMOS, J. P.; GERASIMENKO, O. V.; TEPIKIN, A. V.; GREEN, G. M.; REEVE, J. R. JR.; PETERSEN, O. H.; SUTTON, R. Direct activation of cytosolic Ca²⁺ signaling and enzyme secretion by cholecystokinin in human pancreatic acinar cells. **Gastroenterology**,v. 135, n. 2, p. 632–641, 2008.

NAISHMITH, J. H.; FIELD, R. A. Structural basis of trimannoside recognition by concanavalin A. **J Biol Chem**, v. 271, n. 2, p. 972–976, 1996.

NETTER, F. H. **Atlas de anatomia humana**. 40. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 640 p.

NEUMANN, D.; LEHR, C. M.; LENHOF, H. P.; KOHLBSCHER, O. Computational modeling of the sugar-lectin interaction. **Adv Drug Delivery Rev**, v. 56, n. 3, p. 437-457, 2004.

NEVES, S. A.; FREITAS, A. L.; SOUSA, B. W.; ROCHA, M. L.; CORREIA, M. V.; SAMPAIO, D. A.; VIANA, G. S. Antinociceptiveproperties in miceof a lectinisolatedfromthe marine alga *Amansiamultifida*Lamouroux. **Braz J MedBiol Res.**, v. 40, p. 127-34, 2007.

NOLDIN, V. F.; ISAIAS, D. B.; CECHINEL FILHO, V. Gênero *Calophyllum*: importância química e farmacológica. **Quím nova**, v. 29, p. 549-554, 2006.

NORTON, I. D.; APTE, M. V.; LUX, O.; HABER, P. S.; PIROLA, R. C.; WILSON, J. S. Chronic ethanol administration causes oxidative stress in the rat pancreas. **J Lab Clin Med**, v. 131, n. 5, p. 442-446, 1998.

O'KONSKI, M. S.; PANDOL, S. J. Effects of caerulein on the apical cytoskeleton of the pancreatic acinar cell. **J Clin Invest.**, v. 86, p. 1649-1657, 1990.

ODINOKOVA, I. V.; SUNG, K. F.; MARENINOVA, O. A.; HERMANN, K.; GUKOVSKY, I.; GUKOVSKAYA, A. S. Mitochondrial mechanisms of death responses in pancreatitis. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 23, s. S25-S30, 2008.

ODINOKOVA, I. V.; SUNG, K. F.; MARENINOVA, O. A.; HERMANN, K.; EVTODIENKO, Y.; ANDREYEV, A.; GUKOVSKY, I.; GUKOVSKAYA, A. S. Mechanisms regulating cytochrome C release in pancreatic mitochondria. **Gut**, v. 58, n. 3, p. 431-442, 2009.

OMARY, M. B.; LUGEA, A.; LOWE, A. W.; PANDOL, S. J. The pancreatic stellate cell: a star on the rise in pancreatic diseases. **J Clin Invest.**, v. 117, p. 50-59, 2007.

PANDOL, S. J. Acute pancreatitis. **Curr Opin Gastroenterol.**, v. 22, p. 481-486, 2010.

PANDOL, S. J. Acute pancreatitis. **Curr Opin Gastroenterol.**, v. 21, n. 5, p. 538-543, 2005.

PANDOL, S. J.; SALUJA, A. K.; IMRIE, C. W.; BANKS, P. A. Acute pancreatitis: bench to the bedside. **Gastroenterology**, v. 132, p. 1127-1151, 2007.

PAPACHRISTOU, G. I.; WHITCOMB, D. C. Inflammatory markers of disease severity in acute pancreatitis. **Clin Lab Med.**, v. 25, p. 17-37, 2005.

PEIKIN, S. R.; ROTTMAN, A. J.; BATZRI, S.; GARDNER, J. D. Kinetics of amylase release by dispersed acini prepared from guinea pig pancreas. **Am J Physiol.**, v. 235, n. 6, p. E743-749, 1978

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol**, v. 109, n. 2, p. 347-352, 1995.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J.; BARRE, A.; ROUGE, P. Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionarily related proteins. **Adv Exp Med Biol.**, v. 491, p. 27-54, 2001.

PINTO, R. M.; DE DIOS, I.; URUÑUELA, A.; ORFAO, A.; MANSO, M. A. Alterations in the glycoconjugates of pancreatic cell membrane induced by acute pancreatitis. **European Journal of Cell Biology**, v. 79, p. 62-69, 2000.

PIRES, A. F. Atividade Antinociceptiva de uma Lectina de Semente de *Canavalia brasiliensis* MART. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2008.

PRATAP, J. V.; JEYAPRAKASH, A. A.; RANI, P.G; SEKAR, K.; SUROLIA, A.; VIJAYAN, M. Crystal structures of artocarpin, a Moraceae lectin with mannose specificity, and its complex with methyl- α -D-mannose: implications to the generation of carbohydrate specificity. **J Mol Biol**, v. 317, n. 2, p. 237–247, 2002.

PUPO, M. T.; GUIMARÃES, D. O.; FURTADO, N. A. J. C.; BORGES, W. S. Microbial natural products: a promising source of bioactive compounds. In: TAFT, C. A. **Modern biotechnology in medicinal chemistry and industry**. Kerala: Research Signpost, 2006. 51-78 p.

RARATY, M. G.; MURPHY, J. A.; MCLOUGHLIN, E.; SMITH, D.; CRIDDLE, D.; SUTTON, R. Mechanisms of acinar cell injury in acute pancreatitis. **Scand J Sur.**, v. 94, p. 89-96, 2005.

RARATY, M.; WARD, J.; ERDEMLI, G.; VAILLANT, C.; NEOPTOLEMOS, J. P.; SUTTON, R. Calcium-dependent enzyme activation and vacuole formation in the apical granular region of pancreatic acinar cells. **Proc Natl Acad Sci.**, v. 97, p. 13126-13131, 2000.

ROBERTS, D. D.; GOLDSTEIN, I. J. Adenine binding sites of the lectin from lima beans (*Phaseolus lunatus*). **J Biol Chem**, v. 258, n. 22, p. 13820–13824, 1983.

RODRIGUEZ, D.; CAVADA, B. S.; ABREU-DE-OLIVEIRA, J. T.; DE AZEVEDOMOREIRA, R.; RUSSO, M. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. **Braz J Med Biol Res**, v. 25, n. 8, p. 823–826, 1992.

ROSA, I.; PAIS, M. J.; FÁTIMA, C.; QUEIROZ, A. Pancreatite aguda: Atualização e proposta de protocolo de abordagem. **Acta MédPort**, v. 17, p. 317–324, 2004.

ROY, B.; PATTANAIK, A. K.; DAS, J.; BHUTIA, S. K.; BEHERA, B.; SINGH, P.; MAITI, T. K. Role of PI3K/Akt/mTOR and MEK/ERK pathway in Concanavalin A induced autophagy in HeLa cells. **ChemBiol Interact.**, v. 210, p. 96-102, 2014.

RUBIN, E.; GORSTEIN, F.; RUBIN, R.; SCHWARTING, R.; STRAYER, D. **Patologia: Bases Clinicopatológicas da Medicina**. 4a ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2010.

RUDIGER, H.; GABIUS, H. J. Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. **Glycoconjugate J**. v. 18, p. 589-613, 2001.

RUSSI, M. A.; VANDRESEN-FILHO, S.; RIEGER, D. K.; COSTA, A. P.; LOPES, M. W.; CUNHA, R. M.; TEIXEIRA, E. H.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; TASCIA, C. I.; LEAL, R. B. ConBr, a lectin from *Canavalia brasiliensis* seeds, protects against quinolinic acid-induced seizures in mice. **Neurochem Res**, v. 37, n. 2, p. 288–297, 2012.

SAHIN-TOTH, M. The pathobiochemistry of hereditary pancreatitis: studies on recombinant human cationic trypsinogen. **Pancreatology**, v. 1, p. 461-465, 2001.

SANKARAN, H.; LEWIN, M. B.; WONG, A.; DEVENEY, C. W.; WENDLAND, M. F.; LEIMGRUBER, R. M.; GEOKAS, M. C. Irreversible inhibition by acetaldehyde of cholecystokinin-induced amylase secretion from isolated rat pancreatic acini. **Biochem. Pharmacol.**, v. 34, n. 16, p. 2859–2863, 1985.

SANZ-APARICIO, 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 Lett.**, v. 405, p. 114–118, 1997.

SARKAR, M.; MAJUMDER, G.C.; CHATTERJEE, T. Goat sperm membrane: lectin-binding
SAUER, J. Revision of *Canavalia*. **Brittonia**, v. 16, n. 2, p. 106–181, 1964.

SCHILD, L.; MATTHIAS, R.; STANARIUS, A.; WOLF, G.; AUGUSTIN, W.; HALANGK, W. Induction of permeability transition in pancreatic mitochondria by cerulein in rats. **Mol Cell Biochem.**, v. 195, n. 1-2, p. 191–197, 1999.

SHARON, N.; LIS, H. Carbohydrates in cell recognition. **Sci Am**, v. 268, n. 1, p. 82–88, 1993.

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

SHARON, N.; LIS, H. Lectins--proteins with a sweet tooth: functions in cell recognition. **Essays Biochem**, v. 30, p. 59–75, 1995.

SHARON, N.; LIS, H. Legume lectins--a large family of homologous proteins. **FASEB J**, v. 4, n. 14, p. 3198–3208, 1990.

SILVA, F. O.; ARAÚJO, R. V. S.; SCHIRATO, G. V.; TEIXEIRA, E. H.; MELO JÚNIOR, M. R.; CAVADA, B. S.; LIMA-FILHO, J. L.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; PORTO, A. L. F. Perfil de proteases de lesões cutâneas experimentais em camundongos tratadas com a lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis*. **Ciência Rural**, v. 39, n. 6, p. 1808–1814, 2009.

SILVA, F. O.; SANTOS, P. D.; FIGUEIRÔA, E. O.; DE MELO, C. M.; DE ANDRADE LEMOINE NEVES, J. K.; ARRUDA, F. V.; CAJAZEIRAS, J. B.; DO NASCIMENTO, K. S.; TEIXEIRA, E. H.; CAVADA, B. S.; PORTO, A. L.; PEREIRA, V. R. Antiproliferative effect of *Canavalia brasiliensis* lectin on B16F10 cells. **Res Vet Sci**, v. 96, n. 2, p. 276–282, 2014.

SIMON, S. I.; GREEN, C. E. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. **Annu Rev Biomed Eng**, v. 7, p. 151–185, 2005.

SINGH, R. S.; TIWARY, A. K.; KENNEDY, J. F. Lectins: sources, activities and applications. **Cr Rev Biotechn**, v. 19, p. 145–178, 1999.

SINHA, S.; GUPTA, G.; VIJAYAN, M.; SUROLIA, A. Subunit assembly of plant lectins. **Curr Opin Struct Biol**, v. 17, n. 5, p. 498–505, 2007.

STILLMARK, H. Uber Ricin ein giftiges ferment aus den Samen von Ricinus communis L. und einige anderen Euphorbiaceen. **Inaugural Dissertation Dorpat**, Tartu, 1888.

SUEN, Y. K.; FUNG, K. P.; CHOY, Y. M.; LEE, C. Y.; CHAN, C. W.; KONG, S. K. Concanavalin A induced apoptosis in murine macrophage PU5-1.8 cells through clustering of mitochondria and release of cytochrome c. **Apoptosis**, v. 5, n. 4, p. 369-377, 2000.

SUMNER, J. B. The globulins of jack bean, *Canavalia ensiformis*. **J Biol Chem.**, v. 37, p. 137-142, 1919.

SUMNER, J.B.; HOWELL, S.F. Identification of Hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. **J Bacteriol**, v. 32, n. 2, p. 227-237, 1936.

SUSEELAN, K. N.; MITRA, R.; PANDEY, R.; SAINIS, K. B.; KRISHNA, T. G. Purification and characterization of a lectin from wild sunflower (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. **Arch Biochem Biophys**, v. 407, n. 2, p. 241-247, 2002.

TALUKDAR, R.; SWAROOP-VEGE, S. Early management of severe acute pancreatitis. **Curr Gastroenterol Rep.**, v. 13, p. 123-130, 2011.

THIRUVENGADAM. M.; GAJENDRAN, M.; THIRUVENGADAM, S.; RAGHURAM, K.; SEEMA, R.; DEVARAJ, P. Acute Pancreatitis. **Disease-A-Month**, v. 58, p. 98-144, 2012.

TINEL, H.; CANCELA, J. M.; MOGAMI, H.; GERASIMENKO, J. V.; GERASIMENKO, O. V.; TEPIKIN, A. V.; PETERSEN, O. H. Active mitochondria surrounding the pancreatic acinar granule region prevent spreading of inositol trisphosphate-evoked local cytosolic Ca(2+) signals. **EMBO J**, v. 18, n.18, p. 4999-5008, 1999.

TOOLI, J.; BROOKE-SMITH, M.; BASSI, C.; CARR-LOCKE, D.; TELFORD, J.; FREENY, P.; IMRIE, C.; TANDON, R. Guidelines for management of acute pancreatitis. **J Gastroenterol Hepatol.**, v. 17, p. 15-39, 2002.

UHL, W.; WARSHAW, A.; IMRIE, C.; BASSI, C.; MCKAY, C. J.; LANKISCH, P. G.; CARTER, R.; DI MAGNO, E.; BANKS, P. A.; WHITCOMB, D. C.; DERVENIS, C.; ULRICH, C. D.; SATAKE, K.; GHANEH, P.; HARTWIG, W.; WERNER, J.; MCENTEE, G.; NEOPTOLEMOS, J. P.; BÜCHLER, M. W. IAP Guidelines for the surgical management of acute pancreatitis. **Pancreatology**, v. 2, p. 565-573, 2002.

UNITT, J.; HORNIGOLD, D. Plant lectins are novel Toll-like receptor agonists. **BiochemPharmacol.**, v. 81, p. 1324-1328, 2011.

VAN DAME, E. J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P.; PEUMANS, W. J. Cytoplasmatic/nuclear plant lectins: a new story. **Trends Plant Sci.** v. 9, n. 10, p. 484-489, 2004.

VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J.; BARRE, A.; ROUGÉ, P. Plant Lectins: A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse. **Crit Rev Plant Sci**, v. 17, n. 6, p. 575-692, 1998.

VAN PARIJS, J.; BROEKAERT, W.E.; GOLDSTEIN, J. I. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevein brasiliensis*) latex. **Planta**, v.183, n. 2, p.258-262, 1991.

VEGE S, WHITCOMB D, GROVER S. Etiology of acute pancreatitis. UpToDate 2012. Disponível em <www.uptodate.com>

VEIGA-JUNIOR, V. F.; MELLO. J. C. P. As monografias sobre plantas medicinais. **Rev Bras Farmacogn.**, v. 18, p. 464-471, 2008.

VORONINA, S. G.; GRYSHCHENKO, O. V.; GERASIMENKO, O. V.; GREEN, A. K.; PETERSEN, O. H.; TEPIKIN, A. V. Bile Acids Induce a Cationic Current, Depolarizing Pancreatic Acinar Cells and Increasing the Intracellular Na⁺ Concentration. **J Biol Chem**, v. 280, n. 3, p. 1764–1770, 2005.

VORONINA, S.; LONGBOTTOM, R.; SUTTON, R.; PETERSEN, O. H.; TEPIKIN, A. Bile acids induce calcium signals in mouse pancreatic acinar cells: implications for bile-induced pancreatic pathology. **J Physiol.**, v. 540, p. 49-55, 2002.

WANG, G. J.; GAO, C. F.; WEI, D.; WANG, C.; DING, S. Q. Acute pancreatitis: etiology and common pathogenesis. **World J Gastroenterol.**, v. 15, p. 1427-1430, 2009.

WANG, H. X.; NG, T. B. Concurrent isolation of a Kunitz-type trypsin inhibitor with antifungal activity and a novel lectin from *Pseudostellaria heterophylla* roots. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 342, n. 1, p. 349–353, 2006.

WANG, J.; CHEN, G.; GONG, H.; HUANG, W.; LONG, D.; TANG, W. “Amelioration of experimental acute pancreatitis with dachengqi decoction via regulation of necrosis-apoptosis switch in the pancreatic acinar cell,” **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 2012.

WANG, Y. L.; HU, R.; LUGEA, A.; GUKOVSKY, I.; SMOOT, D.; GUKOVSKAYA, A. S.; PANDOL, S. J. Ethanol feeding alters death signaling in the pancreas. **Pancreas**, v. 32, n. 4, p. 351–359, 2006.

WARD, J. B.; PETERSEN, O.H.; JENKINS, S. A.; SUTTON, R. Is an elevated concentration of acinar cytosolic free ionised calcium the trigger for acute pancreatitis? **Lancet**, v. 346, p.1016-1019, 1995.

WARTMANN, T.; MAYERLE, J.; KÄHNE, T.; SAHIN-TÓTH, M.; RUTHENBÜRGER, M.; MATTHIAS, R.; KRUSE, A.; REINHECKEL, T.; PETERS, C.; WEISS, F. U.; SENDLER, M.; LIPPERT, H.; SCHULZ, H. U.; AGHDASSI, A.; DUMMER, A.; TELLER, S.; HALANGK, W.; LERCH, M. M. Cathepsin L inactivates human trypsinogen, whereas cathepsin L-deletion reduces the severity of pancreatitis in mice. **Gastroenterology**, v. 138, n. 2, p. 726–737, 2010.

WASLE, B.; EDWARDSON, J. M. The regulation of exocytosis in the pancreatic acinar cell. **Cell Signal**, v. 14, p. 191-197, 2002.

WATKINS, W.M.; MORGAN, W.T. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel by simple sugars. **Nature**, v. 169, p. 825–826, 1952.

WERNER, J.; LAPOSATA, M.; FERNANDEZ-DEL CASTILLO, C.; SAGHIR, M.; IOZZO, R. V.; LEWANDROWSKI, K. B.; WARSHAW, A. L. Pancreatic injury in rats induced by

fatty acid ethyl ester, a nonoxidative metabolite of alcohol. **Gastroenterology**, v. 113, n. 1, p. 286–294, 1997.

WERNER, J.; SAGHIR, M.; FERNANDEZ-DEL CASTILLO, C.; WARSHAW, A. L.; LAPOSATA, M. Linkage of oxidative and nonoxidative ethanol metabolism in the pancreas and toxicity of nonoxidative ethanol metabolites for pancreatic acinar cells. **Surgery**, v. 129, n. 6, p. 736–44, 2001.

WILLEMER, S., KÖHLER, H., NAUMANN, R., KERN, H. F., ADLER, G. Glycoconjugate pattern of membranes in the acinar cells of the rat pancreas. **Histochemistry** v., 93, p. 319–326, 1990.

WILLIAMS, D. A. Diseases of the exocrine pancreas. In: HALL, E.; SIMPSON, J. W.; WILLIAMS, D. A. **BSAVA Manual of Canine and Feline Gastroenterology**. 2. ed. London: BSAVA, 2005.

WILLIAMS, J. A. Intracellular signaling mechanisms activated by cholecystokinin-regulating synthesis and secretion of digestive enzymes in pancreatic acinar cells. **Annu Rev Physiol.**, v. 63, p. 77-97, 2001.

WILLIAMS, J. A.; CARY, P.; MOFFAT, B. Effects of ions on amylase release by dissociated pancreatic acinar cells. **Am J Physiol.**, v. 231, p. 1562-1567, 1976.

WILLIAMS, J. A.; KORC, M.; DORMER, R. L. Action of secretagogues on a new preparation of functionally intact, isolated pancreatic acini. **Am J Physiol.**, v. 235, p. 517-524, 1978.

ZATTA, P. F.; CUMMINGS, R. D. Lectins and their uses as biotechnological tools. **Biochem Educ.**, v. 20, p. 2-9, 1992.

ZHANG, H.; PATEL, S. A.; KANDIL, E.; MUELLER, C. M.; LIN, Y-Y.; ZENILMAN, M. E. Pancreatic elastase is proven to be a mannose-binding protein – implications for the systemic response to pancreatitis. **Surgery**, v. 133, p. 678-688, 2003.

ZHANG, G.; SUN, J.; WANG, H.; NG, T. B. First isolation and characterization of a novel lectin with potent antitumor activity from a *Russula mushroom*. **Phytomedicine**, v. 17, p. 775-781, 2010.

ZHAO, R.; GUERRAH, A.; TANG, H.; ZHAO, Z. J. Cell surface glycoprotein PZR is a major mediator of concanavalin A-induced cell signaling. **J Biol Chem.**, v. 277, p. 7882-7888, 2002.