



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

**MIRELLA LEITE PEREIRA**

**ASPECTOS ESTRUTURAIS, FARMACOLÓGICOS E  
TOXICOLÓGICOS DE *Mo*-CBP<sub>4</sub>, UMA PROTEÍNA LIGANTE À  
QUITINA DE *Moringa oleifera* COM ATIVIDADE ANTI-  
INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA VIA ORAL**

**FORTALEZA – CEARÁ**

**2014**

MIRELLA LEITE PEREIRA

---

ASPECTOS ESTRUTURAIS, FARMACOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS DE *Mo-CBP<sub>4</sub>*, UMA PROTEÍNA LIGANTE À QUITINA DE *Moringa oleifera* COM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA VIA ORAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do título de doutor em Bioquímica.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ilka Maria Vasconcelos

**FORTALEZA – CEARÁ**

**2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

---

P493a

Pereira, Mirella Leite.

Aspectos estruturais, farmacológicos e toxicológicos de *Mo*-CBP<sub>4</sub>, uma proteína ligante à quitina de *Moringa oleifera* com atividade anti-inflamatória e antinociceptiva via oral / Mirella Leite Pereira. – 2014.

210 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2014.

Área de Concentração: Bioquímica vegetal.

Orientação: Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos.

1. Biotecnologia farmacêutica. 2. Lectinas 3. Fitoquímicos. I. Título.

---

CDD 574.192

MIRELLA LEITE PEREIRA

---

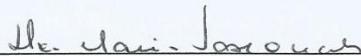
ASPECTOS ESTRUTURAIS, FARMACOLÓGICOS E TOXICOLÓGICOS DE Mo-CBP<sub>4</sub>, UMA PROTEÍNA LIGANTE À QUITINA DE *Moringa oleifera* COM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA VIA ORAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção do título de doutor em Bioquímica.

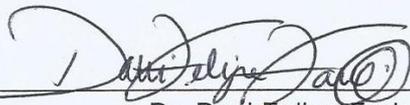
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ilka Maria Vasconcelos.

Aprovada em: 12\03\2014

**BANCA EXAMINADORA**



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ilka Maria Vasconcelos  
Universidade Federal do Ceará (Orientadora)



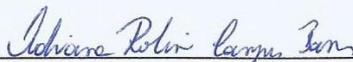
Dr. Davi Felipe Farias  
Universidade Federal do Ceará



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Universidade Federal do Ceará



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Ferreira Santos  
Universidade Estadual do Ceará



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Rolim Campos Barros  
Universidade de Fortaleza

À minha amada avó Leó.

## AGRADECIMENTOS

---

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ilka Maria Vasconcelos, minha orientadora desde que a conheci na disciplina de Bioquímica, em 2005, durante a minha graduação. Um exemplo de pessoa e de professora a ser seguido. Muito obrigada por todos os ensinamentos, tanto para a minha carreira científica como para a vida. Tenho muito orgulho de tê-la como minha orientadora.

Ao Prof. Dr. Hermógenes David por ter me ensinado muito do que sei hoje, desde a minha iniciação científica.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Nylane Maria por ter me acolhido tão bem em seu laboratório. Obrigada, professora, pelos ensinamentos e por ser sempre tão prestativa comigo.

À Prof.<sup>a</sup> Ana de Fátima por ter compartilhado de sua experiência científica, mostrando ser uma mulher guerreira e exemplo a ser seguido. Obrigada por ter me acolhido em seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Davi Farias pelos ensinamentos e momentos de descontração. Obrigada por aceitar participar da banca examinadora.

Às Professoras Dr.<sup>a</sup> Ana Maria Assreuy e Dr.<sup>a</sup> Adriana Rolim por aceitarem participar como membros da banca examinadora.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> e amiga Daniele de Sousa e sua família (Paulo Silas e Thaís), por serem meus companheiros, dentro e fora do laboratório, durante toda essa jornada. Os considero como parte da minha família.

Aos professores Dr. José Tadeu e Dr. Francisco Campos pelos ensinamentos e apoio dados. Obrigada pela amizade.

À Prof.<sup>a</sup> Ana Cristina e todas as pessoas que compõem o seu laboratório na UNIFOR, em especial Dr. Frederico Moreno (Pepeu) e Marina Lobo, pelas análises espectroscópicas.

À minha amigona Dr.<sup>a</sup> Janne Keila, que mesmo na Alemanha, está quase todo dia falando comigo. Muito obrigada pela amizade verdadeira e por ser um exemplo de pessoa tão amável e sincera.

Aos amigos do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC: Dr.<sup>a</sup> Karol Aragão, Dr.<sup>a</sup> Ingrid Samantha, Tamiris Goebel, Luana David e Gisele Pinheiro e a todos os integrantes do laboratório da Prof.<sup>a</sup> Nylane. Um agradecimento especial à

Patrícia Luz por ter me ajudado imensamente com os experimentos na Farmacologia e por se tornar uma grande amiga para mim.

Aos amigos do Bioprospec: Luís Carlos, Leonardo, Pedro, Terezinha e Glauber. Às amigas de mestrado e doutorado que tanto amo Nathanna Mateus e Lady Clarissa.

Aos meus amigos do Laboratório de Proteínas de Defesa de Plantas: Pedro Filho (Pedim), Fredy Albuquerque, Vladimir Magalhães, Handerson Ribeiro, Rodolpho Guedes, Ana Lídia e Ana Luíza. Direta ou indiretamente vocês participaram deste trabalho.

Aos amigos do BioAp: Hélio Job, Andréa Costa e Dyély Campos. Por todo o companheirismo, obrigada.

Aos meus amigos (irmãos) da família Labtox. À “velha guarda” Juliana Gifoni, Geórgia Sampaio, Silvinha, Andréa, Daniel Câmara e Isabel. Aos, nem tão antigos assim, Henrique Pinho e Adelina Batista por toda as ajudas e risadas juntos. Muito obrigada pelos momentos maravilhosos. Aos atuais, Helen Paula, Paulo Carvalho, Vanessa Duarte, Lucas Pinheiro, Mariana Reis, Clídia Eduarda, Xavier, Ana Paula, Bella Gisele, Isabelle Lopes, Nadine Monteiro e Marina Gabriele. Vocês sempre vão morar no meu coração e serei sempre grata pela convivência maravilhosa. À minha IC do coração, Raquel Coelho, por ter sido tão dedicada ao nosso trabalho. Ao casal “nerd” que mais amo, Raquel Rocha e Martônio Viana (e suas famílias) por terem me ajudado dentro e fora do laboratório.

Ao meu amigo Adilton Fontenele (Didi) por ter ajudado a transformar momentos de tensão em momentos mais descontraídos toda vez que comparecia lá no Labtox.

A todos que fazem parte do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC.

Com todo o amor, gostaria de agradecer aos meus pais, Angela Maria e José Luiz por serem tão maravilhosos comigo, por terem me dado todo o suporte na minha educação e, principalmente, por me darem amor! Eu os amo muito, papai e mamãe.

Aos meus irmãos, Larissa Pereira, Mariângela Pereira e Josmar Pereira por serem meus amigos e me apoiar durante toda a minha vida.

Ao amor da minha vida, que escolhi para ficar comigo, meu marido Rubinho Martins. Obrigada por me apoiar e ser meu companheiro durante toda essa jornada acadêmica. Obrigada pelo seu amor! Amo-te demais!

À minha vovozinha Leó, que nos deixou durante a escrita deste trabalho. Por ter sido tão amorosa comigo e exemplo de mulher guerreira.

À minha tia Neile (segunda mãe) por me ajudar e estar tão presente na minha vida. Ao meu primo Marcellus Rocha por me apoiar sempre.

Aos “amorzinhos” Carminha Parente e Breno Belém. Não tenho nem palavras para expressar o que vocês significam para mim. Muito obrigada por tudo.

Aos meus sogros, Rejane Belém e Rubens Albuquerque por todo apoio. Às minhas cunhadas Roberta e Andréa Belém.

Aos meus amigos fora do laboratório: Arihel, Osório, Daniel, Leonardo “Nem”, Pedro, Wanderson, Suzana, Daniele, Valéria Pinheiro, Deise, Dadá e Dangelo, além de tantos outros que tenho o prazer de tê-los na minha vida.

Por fim e, mais importante, agradeço a Deus. Por me dar o dom da vida e o prazer de desfrutá-la. Errando e aprendendo. Por todas as vezes que disse “se Deus quiser vai dar certo” durante os experimentos e ele me concedeu a graça de acertar e concluir este trabalho.

## **AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS**

---

Os trabalhos experimentais que compõem esta tese foram realizados com o apoio das seguintes instituições:

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ** - através das atividades de capacitação no ensino e pesquisa em Bioquímica realizadas em parceria com o **Laboratório de Toxinas Vegetais- LABTOX**, sob coordenação e orientação da Dra. Ilka Maria Vasconcelos.

**UNIVERSIDADE DE FORTALEZA** – através das atividades relacionadas às análises em espectrometria de massas realizadas no laboratório coordenado pela Dr.<sup>a</sup> Ana Cristina De Oliveira Monteiro Moreira.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO** – através das análises espectroscópicas realizadas no Instituto de Física de São Carlos, laboratório coordenado pela Dr.<sup>a</sup> Leila Maria Beltramini.

**CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq)** - através da concessão de bolsa de Pós-Graduação à autora deste trabalho.

**DEMAIS INSTITUIÇÕES DE FOMENTO E APOIO À PESQUISA COMO:** CAPES, FUNCAP e FCPC (UFC) que contribuem para a melhoria nas condições experimentais e na formação de recursos humanos dentro do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da UFC.

**“... and in the end, the love you take is equal to the love you make”  
The Beatles**

## RESUMO

---

*Mo*-CBP<sub>4</sub> é uma proteína ligante à quitina, com atividade anti-inflamatória e antinociceptiva, isolada de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck, uma árvore conhecida pelo seu valor medicinal. Este trabalho teve como objetivo a caracterização estrutural, farmacológica e toxicológica de *Mo*-CBP<sub>4</sub>, com foco na sua utilização como agente terapêutico. *Mo*-CBP<sub>4</sub> é um heterodímero de 11,8 kDa, composto por cadeias de 3,9 kDa e 8,4 kDa. O sequenciamento de *Mo*-CBP<sub>4</sub> por degradação de Edman e espectrometria de massas mostrou a presença de muitos resíduos de aminoácidos básicos e alta similaridade com proteínas isoladas de sementes de *M. oleifera*. Análises espectroscópicas utilizando dicroísmo circular demonstraram que *Mo*-CBP<sub>4</sub> é composta por  $\alpha$ -hélices (36%), folhas- $\beta$  (15%), voltas (19%) e estruturas ao acaso (30%), com alta estabilidade estrutural frente a variações de temperatura e pH. *Mo*-CBP<sub>4</sub> (0,1, 1,0 e 10 mg/kg), por via endovenosa, mostrou atividade anti-inflamatória no modelo de peritonite induzida por carragenina em ratos, com inibição (79%) da migração de neutrófilos já na menor dose. Atividade anti-inflamatória de *Mo*-CBP<sub>4</sub> (40 mg/kg) também ocorreu por via oral em camundongos, usando o mesmo modelo citado, com significativa inibição (48%) da migração de neutrófilos. Tal atividade permaneceu mesmo após aquecimento da proteína a 100 °C por 1 hora, porém, a pré-incubação com *N*-acetil-D-glucosamina 0,1 M foi capaz de reverter sua ação. Os níveis séricos de IL-1 $\beta$  e IL-10, após indução de peritonite, sofreram alteração com o pré-tratamento da proteína. Adicionalmente, *Mo*-CBP<sub>4</sub> (10 mg/kg) mostrou atividade antinociceptiva, verificada através do teste da formalina (2,5%), quando administrada via intraperitoneal, inibindo apenas a dor periférica. No modelo de hipernocicepção mecânica induzida por carragenina, animais tratados via oral com a proteína (20, 40 e 80 mg/kg), 1 hora antes do agente inflamatório, mostraram-se mais resistentes à sensibilização após 1, 3 e 5 horas, apresentando inibição máxima na dose de 40 mg/kg, estando essa atividade relacionada com a redução da migração de neutrófilos. A hipernocicepção direta causada por PGE<sub>2</sub> ou epinefrina não sofreu alteração com o pré-tratamento de *Mo*-CBP<sub>4</sub>. A proteína também não causou comprometimento na atividade locomotora dos animais, quando submetidos ao teste do campo aberto. A administração oral de *Mo*-CBP<sub>4</sub> em dose única (2000 mg/kg) ou em doses repetidas (10, 40 e 100 mg/kg) não resultou em efeitos tóxicos ou adversos. Similarmente,

avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade de *Mo-CBP<sub>4</sub>*, utilizando células tumorais ou normais, mostrou ausência de toxicidade. Os resultados obtidos sugerem que devido às propriedades anti-inflamatória e antinociceptiva, alta estabilidade e aparente ausência de toxicidade, *Mo-CBP<sub>4</sub>* possui grande potencial como um futuro biofármaco.

**Palavras-chave:** *Moringa oleifera*; proteínas ligantes à quitina; atividade antinociceptiva; atividade anti-inflamatória, toxicidade.

## ABSTRACT

---

*Mo*-CBP<sub>4</sub> is a chitin-binding protein that is associated with the antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Moringa oleifera* seeds, a tree known for its medicinal value. The aim of this study was the structural, pharmacological and toxicological characterization of *Mo*-CBP<sub>4</sub>, focusing on its use as a therapeutic agent. *Mo*-CBP<sub>4</sub> is a 11.8 kDa heterodimer, composed by 3.9 kDa and 8.4 kDa chains. *Mo*-CBP<sub>4</sub> sequencing by Edman degradation and mass spectrometry showed the presence of many basic amino acid residues and high similarity with other proteins from *M. oleifera* seeds. Circular dichroism spectroscopy showed that the *Mo*-CBP<sub>4</sub> contains 36%  $\alpha$ -helix, 15%  $\beta$ -sheet, 19% turn and 30% unordered and high structural stability to temperature and pH variations. *Mo*-CBP<sub>4</sub> (0.1, 1.0 and 10 mg/kg) by intravenous administration showed anti-inflammatory activity on the model of carrageenan-induced peritonitis in rats, with inhibition (79%) of neutrophil migration already at the lowest dose. *Mo*-CBP<sub>4</sub> (40 mg/kg), when administered by oral route on mice, using the same mentioned model, also presented anti-inflammatory activity, causing a significant inhibition (48%) of neutrophil migration. *Mo*-CBP<sub>4</sub> retained this activity even after heating at 100 °C or pre-incubation with 0.1 M *N*-acetyl-D-glucosamine, both for 1 hour. Serum levels of IL-1 $\beta$  and IL-10 after peritonitis induction changed in *Mo*-CBP<sub>4</sub>-pretreated mice. In addition, *Mo*-CBP<sub>4</sub> (10 mg/kg), administered intraperitoneally, also showed antinociceptive activity by using the formalin (2.5%) test in mice model, inhibiting just the peripheral pain. In the carrageenan-induced mechanical hypernociception model, animals pretreated with oral *Mo*-CBP<sub>4</sub> (20, 40 and 80 mg/kg), 1 hour prior to inflammatory agent use, proved to be more resistant to sensitization after 1, 3 and 5 hours, with maximal inhibition at a dose of 40 mg/kg, being this activity correlated with the reduction of neutrophil migration. Direct hypernociception caused by epinephrine or PGE<sub>2</sub> was not affected with *Mo*-CBP<sub>4</sub> pretreatment. *Mo*-CBP<sub>4</sub> did not impair the locomotor activity of animals in the open field test. In general, no toxic signs or adverse effects were seen after oral administration of *Mo*-CBP<sub>4</sub> at a single dose (2000 mg/kg) or after repeated doses (10, 40 and 100 mg/kg). Similarly, cytotoxicity and genotoxicity tests with *Mo*-CBP<sub>4</sub>, using tumour or normal cells, showed no toxicity. The results suggest that due to anti-inflammatory and antinociceptive

properties, high stability and apparent lack of toxicity, *Mo*-CBP<sub>4</sub> has great potential as a future biopharmaceutical drug.

**Keywords:** *Moringa oleifera*, chitin-binding protein; antinociceptive activity, anti-inflammatory activity, toxicity.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

Figura 1 -	Etapas do processo de migração leucocitária dos vasos sanguíneos para o local da inflamação.	31
Figura 2 -	<i>Moringa oleifera</i> Lamarck.	49
Figura 3 -	Associação entre os países que têm maior índice de desnutrição e aqueles onde a <i>Moringa</i> cresce.	51

### CAPÍTULO 2

Figura 1 -	Esquema geral de purificação da <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> a partir de farinha delipidada de sementes de <i>M oleifera</i> .	67
Figura 2 -	Cromatografia de afinidade em matriz de quitina.	73
Figura 3 -	Cromatografia de troca iônica em matriz de CM-Sepharose.	74
Figura 4	Perfil eletroforético da <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> em condições desnaturantes.	75
Figura 5 -	Espectro de massa de <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> íntegra por TOF-ESI-MS.	77
Figura 6 -	Espectro de massa de <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> reduzida por TOF-ESI-MS.	78
Figura 7 -	Cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa de <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> .	82
Figura 8 -	Alinhamento das sequências NH <sub>2</sub> -terminal correspondentes às cadeias A e B de <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> e isoformas do precursor de albumina 2S.	85
Figura 9 -	Espectro de absorção eletrônica de <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> .	87
Figura 10 -	Espectro de dicroísmo circular de <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> nativa.	88

Figura 11-	Avaliação da estabilidade térmica de <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> por dicroísmo circular.	91
Figura 12 -	Avaliação da estabilidade de <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> frente a diferentes pHs por dicroísmo circular.	92
Figura 13 -	Espectro de fluorescência de <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> .	93

### CAPÍTULO 3

Figura 1 -	<i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> (e.v.) reduz a migração de neutrófilos induzida por carragenina em ratos	117
Figura 2 -	<i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> (v.o.) reduz a migração de neutrófilos induzida por zymosan em camundongos	118
Figura 3 -	<i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> mantém a atividade anti-inflamatória, mesmo após tratamento térmico a 100 °C, por 1 hora	120
Figura 4 -	<i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> associada ao açúcar específico, <i>N</i> -acetil-D-glucosamina 0,1 M, não possui efeito inibitório sobre a migração de neutrófilos induzida por zymosan em camundongos	121
Figura 5 -	<i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> altera os níveis de IL-1 $\beta$ e IL-10, mas não de TNF- $\alpha$ , no soro de camundongos, em modelo de peritonite induzida por zymosan	122
Figura 6 -	<i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> não altera os níveis de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ e IL-10 no fluido peritoneal de camundongos, em modelo de peritonite induzida por zymosan	123
Figura 7 -	<i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> (i.p.) reduz o tempo de lambertura da pata de camundongos induzida por formalina 2,5%	125
Figura 8 -	<i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> reduz hipernocicepção inflamatória aguda em camundongos induzida por carragenina	126

Figura 9 -	<i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> inibe a migração de neutrófilos induzida por carragenina na pata de camundongos	128
Figura 10 -	<i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> não reduz a hipernocicepção inflamatória aguda induzida por PGE <sub>2</sub> ou epinefrina	129
Figura 11 -	<i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> não afeta a atividade locomotora de camundongos submetidos ao campo aberto	130

#### CAPÍTULO 4

Figura 1 -	Perfil do ganho de massa corpórea de camundongos tratados com única dose de <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub>	158
Figura 2 -	Perfil do ganho de massa corpórea de camundongos tratados com diferentes doses de <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub>	159
Figura 3 -	Efeito no consumo de ração de camundongos tratados com diferentes	161
Figura 4	Avaliação da atividade citotóxica de <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> utilizando o método do ATPlite™	172
Figura 5 -	Fotografia de células de carcinoma de mama MCF-7 expostas às lectinas <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> e ConA	174
Figura 6 -	Avaliação da atividade genotóxica de <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> utilizando o teste do cometa	175

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

Tabela 1 -	Etapas de purificação da <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> , com os respectivos teores e rendimentos proteicos.	72
Tabela 2 -	Sequências dos peptídeos 1, 2 e 3 obtidas a partir da digestão tríptica de <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> .	79
Tabela 3 -	Sequência do peptídeo 4 obtido a partir da digestão tríptica de <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> .	80
Tabela 4	Análise comparativa da sequência NH <sub>2</sub> -terminal da cadeia A de <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> com proteínas depositadas no NCBI.	83
Tabela 5 -	Análise comparativa da sequência NH <sub>2</sub> -terminal da cadeia B de <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> com proteínas depositadas no NCBI.	84
Tabela 6 -	Distribuição dos padrões de estrutura secundária presentes em <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> e outras proteínas de sementes de <i>M. oleífera</i> .	89

### CAPÍTULO 4

Tabela 1 -	Massa relativa dos órgãos (%) de camundongos machos tratados com <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> em diferentes doses por 28 dias.	162
Tabela 2 -	Massa relativa dos órgãos (%) de camundongos fêmeas tratadas com <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> em diferentes doses por 28 dias.	163
Tabela 3 -	Parâmetros hematológicos de camundongos machos tratados com <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> em diferentes doses por 28 dias.	164
Tabela 4 -	Parâmetros hematológicos de camundongos fêmeas tratadas com <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> em diferentes doses por 28 dias.	165
Tabela 5 -	Parâmetros séricos de camundongos machos tratados com <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> em diferentes doses por 28 dias.	167

Tabela 6 -	Parâmetros séricos de camundongos fêmeas tratadas com <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> em diferentes doses por 28 dias.	168
Tabela 7 -	Análise urinária de camundongos tratados com <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> em diferentes doses por 28 dias.	169
Tabela 8 -	Atividade citotóxica, utilizando o método do MTT em diferentes linhagens de células humanas, após 72 horas de incubação.	171

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

ALT	Alanine Aminotranferase
ANOVA	Analysis of Variance
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato Aminotransferase
ATCC	American Type Culture Collection
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BSA	Bovine Serum Albumin
CEPA	Comitê de Ética de Pesquisa com Animais
Cg	Carragenina
CHCM	Concentração De Hemoglobina Corpuscular Média
CM	Carboximetil
cMoL	Coagulant <i>Moringa oleifera</i> lectin
ConA	Concanavalina A
ConBr	<i>Canavalia brasiliensis</i> Lectin
COX	Ciclo-Oxigenase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic Acid
Dz	Diazepam
e.v.	Endovenosa
ESI-Q-TOF	Electrospray Ionization-Quadripole-Time of Flight
ESI-TOF	Electrospray Ionization-Time Of Flight
FDA	Food and Drug Administration
GlcNac	N-acetil-D-glucosamina
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HDL	High Density Lipoprotein
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
i.p.	Intraperitoneal
IASP	International Association for the Study of Pain
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
iNOS	Inhibitor Nitric Oxide Synthase

LDL	Low density Lipoprotein
Mo-CBP	<i>Moringa oleifera</i> – Chitin Bindin Protein
MPO	Mieloperoxidase
MS	Mass Spectrometry
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-Yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromide
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
P <sub>AC</sub>	Pico eluído por ácido acético
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCL	<i>Phaseolus coccineus</i> Lectin
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E 2
RDW-CV	Red Cell Distribution Width-Coefficient Variation
RIP	Ribosome Inactivating Protein
SCGE	Single Cell Gel Electrophoresis
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TFA	Trifluoroacetic Acid
TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Fator- $\alpha$
UDA	Urtica dioica Agglutinin
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
v.o.	Via Oral
VCM	Volume Corpuscular Médio
VLDL	Very Low Density Lipoproteins
WGA	Wheat Germ Agglutinin
WSmol	Water Soluble <i>Moringa oleifera</i> Lectin
Zy	Zymosan

## SUMÁRIO

---

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

### CAPÍTULO 1

1.	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	28
1.1.	<b>Inflamação e dor: bases biológicas e alvos terapêuticos</b>	28
1.1.1.	<i>Inflamação</i>	28
1.1.2.	<i>Dor</i>	36
1.1.3.	<i>Anti-inflamatórios e a busca de novos fármacos</i>	39
1.2	<b>Lectinas de plantas</b>	42
1.2.1	<i>Aplicações farmacológicas de lectinas de plantas</i>	44
1.3.	<b><i>Moringa oleifera</i> Lamarck: Considerações gerais</b>	47
1.3.1.	<b><i>Potencial farmacológico da M. oleifera</i></b>	53

### CAPÍTULO 2

1.	<b>CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA</b>	60
2.	<b>OBJETIVOS</b>	62
2.1.	<b>Gerais</b>	62
2.2.	<b>Específicos</b>	62
3.	<b>MATERIAIS</b>	63
3.1.	<b>Sementes</b>	63
3.2.	<b>Reagentes químicos e outros materiais</b>	63
4.	<b>MÉTODOS</b>	64
4.1.	<b>Purificação da <i>Mo-CBP<sub>4</sub></i></b>	64

4.1.1.	<i>Determinação do teor de proteínas</i>	65
4.1.2.	<i>Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida</i>	65
4.2.	Espectrometria de massa	66
4.2.1.	<i>Determinação da massa molecular da Mo-CBP<sub>4</sub></i>	66
4.2.2.	<i>Sequência de peptídeos trípticos da Mo-CBP<sub>4</sub></i>	68
4.3.	Determinação da sequência NH <sub>2</sub> -terminal	68
4.4.	Caracterização espectroscópica	69
4.4.1.	<i>Espectro de absorção eletrônica</i>	69
4.4.2.	<i>Espectro de dicroísmo circular</i>	70
4.4.3.	<i>Espectro de fluorescência</i>	70
5.	RESULTADOS	71
5.1.	Purificação da Mo-CBP <sub>4</sub>	71
5.2.	Espectrometria de massa	76
5.2.1.	<i>Determinação da massa molecular de Mo-CBP<sub>4</sub></i>	76
5.2.2.	<i>Sequência de peptídeos trípticos de Mo-CBP<sub>4</sub></i>	76
5.3.	Determinação da sequência NH <sub>2</sub> -terminal	81
5.4.	Caracterização Espectroscópica de Mo-CBP <sub>4</sub>	86
5.4.1.	<i>Espectro de absorção eletrônica</i>	86
5.4.2.	<i>Espectro de dicroísmo circular</i>	86
5.4.3.	<i>Espectro de fluorescência</i>	90
6.	DISCUSSÃO	94
7.	CONCLUSÃO	102

### CAPÍTULO 3

1.	CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA	104
----	--	-----

2.	<b>OBJETIVOS</b>	106
2.1.	<b>Geral</b>	106
2.2.	<b>Específicos</b>	106
3.	<b>MATERIAIS</b>	107
3.1.	<b>Proteína ligante à quitina de <i>M. oleifera</i> (Mo-CBP<sub>4</sub>)</b>	107
3.2.	<b>Reagentes químicos</b>	107
3.3.	<b>Animais</b>	107
4.	<b>MÉTODOS</b>	109
4.1.	<b>Atividade anti-inflamatória de Mo-CBP<sub>4</sub></b>	109
4.1.1.	<b><i>Avaliação do efeito de Mo-CBP<sub>4</sub>, via endovenosa, sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina</i></b>	109
4.1.2.	<b><i>Avaliação do efeito de Mo-CBP<sub>4</sub>, via oral, sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por zymosan</i></b>	109
4.1.2.1.	<i>Avaliação da atividade anti-inflamatória de Mo-CBP<sub>4</sub> após aquecimento</i>	110
4.1.2.2.	<i>Avaliação da participação do sítio de ligação ao carboidrato na atividade anti-inflamatória de Mo-CBP<sub>4</sub></i>	110
4.1.2.3.	<i>Avaliação do efeito de Mo-CBP<sub>4</sub> sobre a liberação de citocinas pró- e anti-inflamatórias</i>	111
4.2.	<b>Atividade antinociceptiva de Mo-CBP<sub>4</sub></b>	112
4.2.1.	<b><i>Avaliação do efeito de Mo-CBP<sub>4</sub> sobre a nocicepção induzida por formalina</i></b>	112
4.2.2.	<b><i>Avaliação do efeito de Mo-CBP<sub>4</sub> sobre a hipernocicepção mecânica induzida por carragenina</i></b>	112

4.2.2.1.	<i>Avaliação do efeito de Mo-CBP<sub>4</sub> sobre a migração de neutrófilos na hipernocicepção mecânica induzida por carragenina</i>	113
4.2.3.	<b><i>Avaliação do efeito de Mo-CBP<sub>4</sub> sobre a hipernocicepção mecânica induzida por prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e epinefrina</i></b>	114
4.2.4.	<b><i>Avaliação do efeito de Mo-CBP<sub>4</sub> sobre a atividade motora de animais submetidos ao campo aberto</i></b>	114
4.3.	<b>Análise estatística</b>	115
5.	<b>RESULTADOS</b>	116
5.1.	<b>Atividade anti-inflamatória de Mo-CBP<sub>4</sub></b>	116
5.1.1.	<b><i>Avaliação do efeito de Mo-CBP<sub>4</sub>, via endovenosa, sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina</i></b>	116
5.1.2.	<b><i>Avaliação do efeito de Mo-CBP<sub>4</sub>, via oral, sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por zymosan</i></b>	116
5.1.2.1.	<i>Avaliação da atividade anti-inflamatória de Mo-CBP<sub>4</sub> após aquecimento</i>	119
5.1.2.2.	<i>Avaliação da participação do sítio de ligação ao carboidrato na atividade anti-inflamatória de Mo-CBP<sub>4</sub></i>	119
5.1.2.3.	<i>Avaliação do efeito de Mo-CBP<sub>4</sub> sobre a liberação de citocinas pró- e anti-inflamatórias</i>	119
5.2.	<b>Atividade antinociceptiva de Mo-CBP<sub>4</sub></b>	124
5.2.1.	<b><i>Avaliação do efeito de Mo-CBP<sub>4</sub> sobre a nocicepção induzida por formalina</i></b>	124

<b>5.2.2.</b>	<b><i>Avaliação do efeito de Mo-CBP<sub>4</sub> sobre a hipernocicepção mecânica induzida por carragenina</i></b>	124
5.2.2.1.	<i>Avaliação do efeito de Mo-CBP<sub>4</sub> sobre a migração de neutrófilos na hipernocicepção mecânica induzida por carragenina</i>	127
<b>5.2.3.</b>	<b><i>Avaliação do efeito de Mo-CBP<sub>4</sub> sobre a hipernocicepção mecânica induzida por prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e epinefrina</i></b>	127
<b>5.2.4.</b>	<b><i>Avaliação do efeito de Mo-CBP<sub>4</sub> sobre a atividade motora de animais submetidos ao campo aberto</i></b>	127
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	131
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	141
<b>CAPÍTULO 4</b>		
<b>1.</b>	<b>CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA</b>	143
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	145
2.1.	<b>Geral</b>	145
2.2.	<b>Específicos</b>	145
<b>3</b>	<b>MATERIAIS</b>	146
3.1.	<b>Animais</b>	146
3.2.	<b>Células</b>	146
3.3.	<b>Reagentes químicos e outros materiais</b>	146
<b>4.</b>	<b>MÉTODOS</b>	148
4.1.	<b>Estudo de toxicidade aguda de Mo-CBP<sub>4</sub> (dose única) via oral em camundongos</b>	148

4.2.	Estudo de toxicidade oral de <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> em doses repetidas (28 dias) em camundongos	148
4.2.1.	<i>Determinação de parâmetros hematológicos</i>	149
4.2.2.	<i>Determinação de parâmetros bioquímicos</i>	150
4.2.3.	<i>Análise urinária</i>	150
4.2.4.	<i>Análise estatística</i>	150
4.3.	Estudo da citotoxicidade de <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub>	151
4.3.1.	<i>Avaliação do potencial hemolítico utilizando eritrócitos de camundongos</i>	151
4.3.2.	<i>Análise da citotoxicidade de <i>Mo</i>-CBP<sub>4</sub> pelo teste do MTT</i>	152
4.3.3.	<i>Teste de viabilidade celular pelo método do ATPlite™</i>	153
4.3.4.	<i>Análise estatística</i>	154
4.4.	Avaliação da atividade genotóxica de <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> utilizando o ensaio do cometa	154
5.	RESULTADOS	157
5.1.	Estudo de toxicidade aguda de <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> (dose única) via oral em camundongos	157
5.2.	Estudo de toxicidade de <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> em doses repetidas (28 dias), por via oral, em camundongos	157
5.2.1.	<i>Parâmetros hematológicos</i>	160
5.2.2.	<i>Parâmetros bioquímicos</i>	166
5.2.3.	<i>Análise urinária</i>	166
5.3.	Estudo da citotoxicidade de <i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub>	170
5.3.1.	<i>Potencial hemolítico em eritrócitos de camundongos</i>	170

<b>5.3.2.</b>	<b><i>Análise da citotoxicidade de Mo-CBP<sub>4</sub> pelo teste do MTT</i></b>	<b>170</b>
<b>5.3.3.</b>	<b><i>Teste de viabilidade celular pelo método do ATPlite™</i></b>	<b>170</b>
<b>5.4.</b>	<b>Avaliação da atividade genotóxica de Mo-CBP<sub>4</sub> utilizando o ensaio do cometa</b>	<b>173</b>
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>176</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>185</b>
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>186</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>188</b>



# **Capítulo 1**

## **Fundamentação Teórica**

## 1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

---

### 1.1. Inflamação e dor: bases biológicas e alvos terapêuticos

#### 1.1.1. Inflamação

A inflamação (do latim *inflamare*, que significa pegar fogo) é um fenômeno já identificado por antigas civilizações, como a mesopotâmica e egípcia, quando deixaram os primeiros registros com relatos médicos. Esta reação era visualizada pelos quatro sinais cardinais, "rubor, calor, tumor e dor", descritos primeiramente por Cornelius Celsus (25 a.C. – 50 d.C.). Rudolf Virchow, no século XIX, atribuiu a descrição de um quinto sinal: a perda da função (MONTENEGRO *et al.*, 1999; FALTAS, 2004).

Trata-se de uma resposta adaptativa desencadeada por estímulos nocivos, tais como infecção e lesão tecidual constituindo-se em uma reação complexa do tecido, que consiste de respostas vasculares, migração de leucócitos e reações sistêmicas. Portanto, a inflamação é uma reação biológica com o intuito de promover a homeostase do tecido perturbado (ASHLEY *et al.*, 2012).

A cinética do processo inflamatório ocorre em dois momentos: fase aguda e crônica. A inflamação de fase aguda é desencadeada logo após a infecção e tem duração de algumas horas até poucos dias. Essa fase caracteriza-se por infiltrado predominantemente neutrofilico no sítio da inflamação, eventos vasculares como extravasamento de material proteico e plasma, aumento da permeabilidade vascular, alterações estruturais da microvasculatura e eventos sistêmicos, tais como aumento da temperatura, dor, elevação do conteúdo plasmático de várias proteínas típicas de fase aguda, como componentes do sistema complemento e proteína-C reativa (BAUHMANN; GAUDIE, 1994).

A fase crônica, que acontece quando há uma falha na resolução da reação de fase aguda, caracteriza-se pela presença de macrófagos e linfócitos, além de angiogênese e proliferação de tecido conjuntivo. A inflamação crônica é considerada um processo prolongado que pode ter semanas ou até anos de duração (BAUHMANN; GAUDIE, 1994).

O primeiro passo da cascata inflamatória envolve o reconhecimento da infecção ou dano, através da detecção de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que são especificamente dirigidos a moléculas expressas por agentes patogênicos, essenciais para a sua sobrevivência. Além disso, padrões moleculares associados a danos (DAMPs), que são moléculas liberadas quando há um dano tecidual, também fazem parte desse reconhecimento para acionar a resposta imune adaptativa. A vantagem de detectar estes sinais é minimizar o direcionamento inapropriado da ação contra células ou tecidos do hospedeiro (JANEWAY *et al.*, 2005). Depois do reconhecimento por células residentes como macrófagos, vias de sinalização culminam na ativação de fatores de expressão como o NF- $\kappa$ B (fator nuclear kappa-B) que induz a produção de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e outras moléculas co-estimulantes. Essas moléculas são responsáveis em controlar dois eventos principais, que caracterizam o mecanismo de ação inflamatório: reação vascular e reação celular (NATHAN, 2002).

A reação vascular consiste em mudanças no fluxo sanguíneo e aumento da permeabilidade dos vasos. Logo após a lesão ocorre uma vasoconstrição reflexa, de origem neurogênica, mediada por terminações do sistema nervoso autônomo que dura poucos segundos. A seguir, tem início à vasodilatação, que primeiro envolve as arteríolas, levando a abertura de novos leitos capilares e aumento do fluxo sanguíneo para a região, provocando calor e rubor (RYAN; MAJNO, 1977). Essas alterações são causadas por substâncias liberadas no local da inflamação, conhecidas como mediadores inflamatórios. Alguns desses mediadores, como a bradicinina, causam dilatação induzindo a liberação de fatores de relaxamento vascular derivados do endotélio (EDRFs). Já foi demonstrado que o óxido nítrico (NO) é um dos EDRFs liberados pelas células endoteliais (PALMER; FERRIG; MONCADA, 1987; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991), que participa do controle do fluxo sanguíneo (FORTES; HYSLOP; DENUCCI, 1994), da expressão de moléculas de adesão e do aumento da permeabilidade vascular induzida pelo fator ativador de plaquetas (PAF) e pela própria bradicinina (MAYHAN, 1992).

A reação celular corresponde ao processo de migração de leucócitos (principalmente neutrófilos) durante a inflamação que é intermediada por diferentes mediadores inflamatórios e quimiotáticos, os quais promovem um aumento das interações entre os neutrófilos e as células endoteliais, favorecendo a migração destes

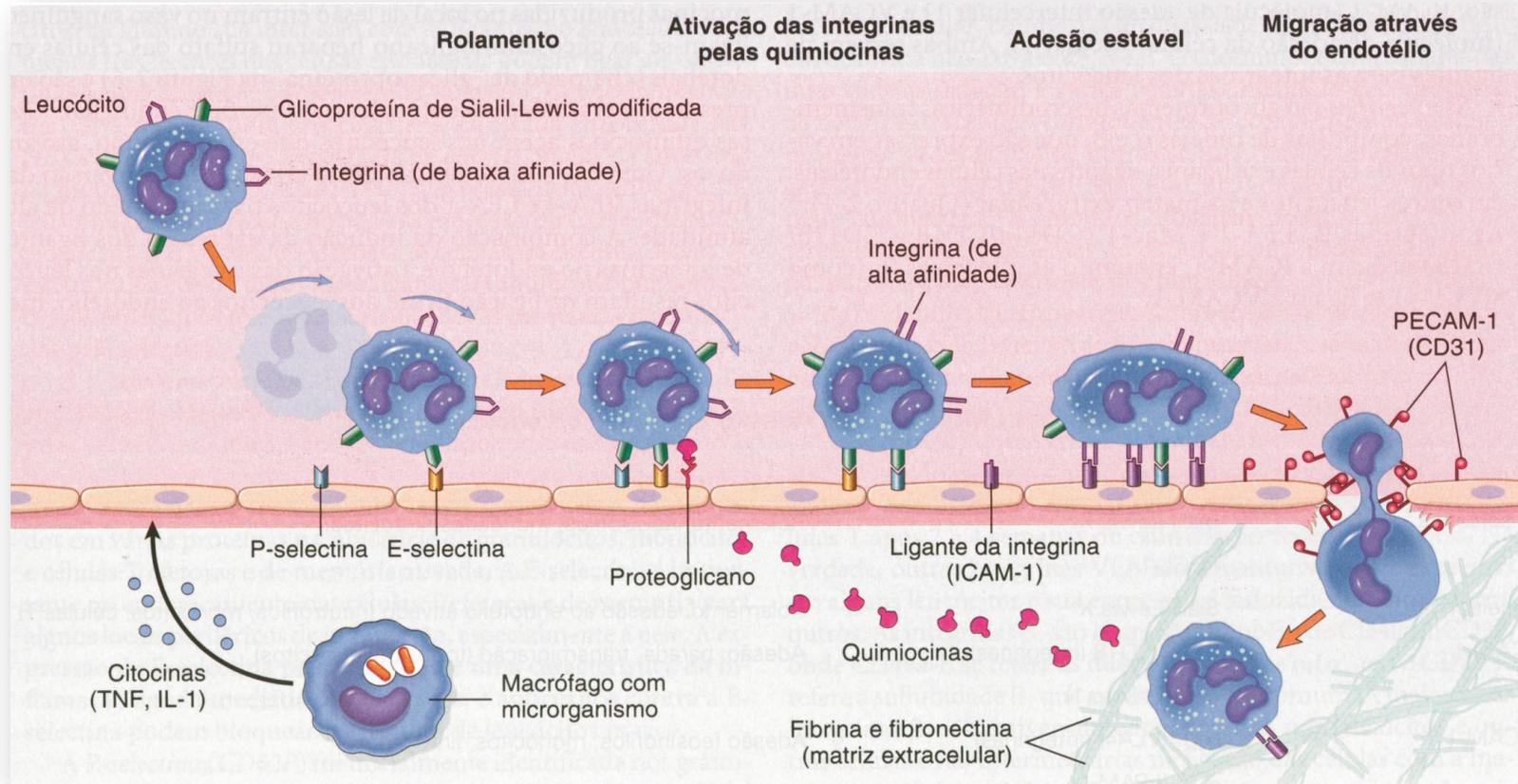
leucócitos a favor do gradiente de concentração em direção à área lesada e as vênulas pós-capilares (HUTTENLOCHER *et al.*, 1995).

Diversas são as células envolvidas no processo inflamatório. Algumas já estão presentes no tecido afetado, tais como: células endoteliais, mastócitos e células mononucleares residentes. Enquanto outras, como os leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, basófilos e eosinófilos) e mononucleares (monócitos e linfócitos) migram para o local da lesão. Os leucócitos são atraídos para a região afetada por um processo conhecido como quimiotaxia (FERREIRA, 1980).

O processo de passagem de leucócitos provenientes do sangue para o tecido inflamado apresenta-se em cinco eventos: marginação, rolamento, adesão, diapedese (com penetração através da membrana basal dos pericitos) e quimiotaxia (FIGURA 1). A identificação de moléculas com propriedades adesivas envolvidas neste processo mostrou que a migração de leucócitos para o foco inflamatório depende de sua interação com células endoteliais, na qual contribuem ativamente através da expressão em suas superfícies de proteínas adesivas, denominadas moléculas de adesão e secreção de mediadores solúveis.

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

**Figura 1 - Etapas do processo de migração leucocitária dos vasos sanguíneos para o local da inflamação.**



Fonte: ROBINS *et al.*, 2005. Os leucócitos rolam na superfície do endotélio, depois são ativados, aderindo a ele, ocorrendo, então, a transmigração através do endotélio; atravessam a membrana basal e migram seguindo um gradiente quimiotático que se origina no local da lesão.

Embora as lectinas endógenas (selectinas) estejam envolvidas no processo de adesão, elas não são as únicas a participarem deste, pois outras moléculas como as imunoglobulinas e as integrinas também contribuem para o mesmo. No entanto, demonstrou-se que as selectinas estão principalmente envolvidas com a fase de rolamento dos leucócitos (PANÉS *et al.*, 1999). Além disso, experimentos utilizando camundongos que não produziam selectinas ou seus ligantes mostraram ineficiência em recrutamento de neutrófilos no processo inflamatório (LOWE, 2002). O mesmo é visualizado em pacientes que sofrem de uma doença rara chamada de deficiência de adesão leucocitária tipo-II (ETZIONI *et al.*, 1999).

Os três tipos de selectinas conhecidos foram denominados de acordo com as células que estão ancoradas (KANSAS, 1996):

- As L-selectinas, encontradas em leucócitos, são responsáveis pelo endereçamento durante a interação com ligantes endoteliais;
- As E-selectinas aparecem em células endoteliais após terem sido ativadas por citocinas pró-inflamatórias, sendo que uma pequena quantidade destas também é encontrada em vários leitos vasculares e parecem ter um papel importante para a migração dos leucócitos;
- As P-selectinas são armazenadas em grânulos-alpha das plaquetas e corpos Weibel-Palade (vesículas intracitoplasmáticas) das células endoteliais, e estão prontamente posicionadas na membrana plasmática após estimulação específica.

À medida que o leucócito rola as L-selectinas se desprendem e as integrinas são ativadas por pelo menos uma variedade de quimiocinas e citocinas associadas à superfície endotelial para dar continuidade ao processo de migração celular.

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

Após o rolamento, segue-se a adesão firme mediada por imunoglobulinas e  $\beta$ -2 integrinas. Essas últimas são proteínas que estão presentes na membrana dos leucócitos e que podem também ter sua expressão aumentada após ativação destas células por mediadores inflamatórios, como PAF ou outras citocinas (GRANGER; KUBES, 1994).

As ICAMs (moléculas de adesão intercelular) são imunoglobulinas que estão presentes no endotélio, sendo que as mais relacionadas ao processo de migração são as ICAM-1 e ICAM-2, VCAM-1 (molécula de adesão vascular-1) e PCAM-1 (molécula de adesão de célula endotelial e plaqueta-1). Mediadores inflamatórios liberados por células residentes ativadas podem agir aumentando a avidéz de ligação entre integrinas e imunoglobulinas, favorecendo a firme adesão (CROSTEIN; WEISSMAN, 1993; PANÉS *et al.*, 1999).

Após a firme fixação, ocorre o achatamento da célula, reduzindo a exposição às forças decorrentes do fluxo sanguíneo, aumentando desta forma a área de contato com a superfície endotelial vascular. Finalmente, o leucócito migra entre as células endoteliais da região apical para a superfície basolateral (diapedese) em direção ao espaço extravascular. Os leucócitos migram nos tecidos em direção à região de agressão por quimiotaxia, já definido anteriormente (RIBEIRO *et al.*, 1996).

O advento dos leucócitos aos locais inflamados ocorrendo em intensidade adequada e em tempo hábil pode ser fundamental para a manutenção da normalidade. No entanto, em diversas situações, a expressão desta reação, isto é, tanto o excesso quanto a falta dessas células no foco da lesão, pode resultar em danos ao organismo. E, isso, é importante porque os leucócitos fagocitam agentes danosos, destroem bactérias e outros micróbios e degradam o tecido necrótico e antígenos estranhos, mas podem prolongar a inflamação e induzir lesão tecidual, liberando enzimas, mediadores químicos e radicais tóxicos de oxigênio e nitrogênio. A mobilização adequada de leucócitos da microcirculação para o local da inflamação é uma das fases fundamentais da reação inflamatória (BEVILACQUA *et al.*, 1994).

Os compostos responsáveis por orquestrar tanto os eventos vasculares como os celulares são os mediadores inflamatórios que, em termos simples, podem ser considerados como mensageiros químicos para a resposta inflamatória. Tais substâncias modulam uma série de eventos locais, como: vasodilatação,

opsonização, quimiotaxia para células inflamatórias, destruição tecidual, febre, mal estar e dor (LANSEN *et al.*, 1993).

Os mediadores celulares podem ser produzidos por leucócitos especializados (particularmente macrófagos residentes e mastócitos) ou pelas células locais presentes nos tecidos. Alguns mediadores (tais como histamina e serotonina) são pré-formados e armazenados em grânulos nos mastócitos, basófilos e plaquetas. Outros são pré-formados e circulam como precursores inativos no plasma. A concentração de plasma destes mediadores pode aumentar acentuadamente como resultado do aumento da secreção dos precursores pelos hepatócitos durante a resposta de fase aguda. Outros mediadores são produzidos diretamente em resposta à estimulação adequada por indutores de inflamação (MEDZHITOV, 2008).

Mediadores inflamatórios podem ser classificados em sete grupos de acordo com suas propriedades bioquímicas: aminas vasoativas, peptídeos vasoativos, fragmentos de componentes do complemento, mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas (MAJNO; JORIS, 2004).

As aminas vasoativas (histamina e serotonina) são produzidas e secretadas quando os mastócitos e plaquetas degranulam. Elas têm efeitos complexos sobre os vasos sanguíneos, causando o aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação ou vasoconstrição, dependendo das condições. As consequências imediatas da sua liberação pelos mastócitos podem ser muito prejudiciais em organismos sensíveis, podendo provocar um choque anafilático, com colapso vascular e respiratório.

Os peptídeos vasoativos podem ser armazenados em uma forma ativa em vesículas secretoras (por exemplo, substância P) ou gerados por processamento proteolítico de precursores inativos no fluido extracelular (por exemplo, cininas, fibrinopeptídeo A e B e produtos de degradação da fibrina). Substância P é liberada por neurônios sensoriais e pode causar degranulação de mastócitos. Outros peptídeos vasoativos são gerados através de proteólise pelo fator de Hageman, trombina ou plasmina e provocar vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (diretamente ou indiretamente através da indução de liberação de histamina a partir de mastócitos).

Fragmentos C3a, C4a e C5a do sistema do complemento (também conhecido como anafilatoxinas) são produzidos por diversas vias de ativação do

complemento. C5a (e em menor extensão C3a e C4a) promove recrutamento de granulócitos e monócitos, além de induzir degranulação de mastócitos, afetando a vasculatura.

Mediadores lipídicos (eicosanoides e fatores de ativação plaquetária) são derivados de fosfolipídios, tais como a fosfatidilcolina, que estão presentes no folheto interno da membrana celular. Após a ativação por Íons  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, fosfolipase  $A_2$  citosólica gera ácido araquidônico e ácido lisofosfatídico, os precursores das duas classes de mediadores lipídicos a partir de fosfatidilcolina. O ácido araquidônico é metabolizado por ciclooxigenases (COX1 e COX2) para formar prostaglandinas e tromboxanos, ou por lipoxigenase, gerando leucotrienos e lipoxinas (MAJNO; JORIS, 2004). As prostaglandinas  $\text{PGE}_2$  e  $\text{PGI}_2$ , por sua vez, provocam vasodilatação.  $\text{PGE}_2$  também é um potente indutor de hiperalgesia e febre (HIGGS; MONCADA; VANE, 1984).

Citocinas inflamatórias como, fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1, IL-6 e muitas outras, são produzidas por diversos tipos de células, principalmente macrófagos e mastócitos. Elas têm vários papéis na resposta inflamatória, incluindo a ativação do endotélio e leucócitos e indução da resposta inflamatória de fase aguda.

Quimiocinas são produzidas por diversos tipos de células em resposta aos indutores da inflamação. Elas controlam o extravasamento de leucócitos e quimiotaxia para os tecidos afetados.

Várias enzimas proteolíticas (incluindo elastina, catepsinas e metaloproteinases da matriz) têm diversos papéis na inflamação, em parte através da degradação da matriz extracelular e proteínas da membrana basal. Estas proteases desempenham papéis importantes em muitos processos de defesa do hospedeiro, incluindo, remodelamento de tecidos e a migração de leucócitos.

Embora o efeito mais evidente de mediadores inflamatórios seja induzir a formação de uma exsudação (através dos seus efeitos sobre os vasos sanguíneos e na migração de leucócitos), muitos outros mediadores inflamatórios têm efeitos, igualmente importante, sobre as funções neuroendócrinas e metabólicas, além da manutenção da homeostase dos tecidos em geral (TURNBULL; RIVIER, 1999). Estas funções dos mediadores inflamatórios refletem em um papel mais geral para a inflamação no controle da homeostase dos tecidos e na adaptação às condições nocivas (MEDZHITOV, 2008).

### 1.1.2. Dor

Dor é definida pela IASP (Associação Internacional para o Estudo da Dor) como uma “*experiência sensorial ou emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial*”. Esta definição agrega à percepção da sensação dolorosa a aspectos psicológicos, sociais, emocionais e ambientais. Isso ocorre porque a dor além de ser uma percepção dos estímulos nocivos quando receptores sensoriais são ativados, também envolve um componente emocional-afetivo incluindo atenção e aprendizagem (BONICA, 1990; NOBACK *et al.*, 1996; LOESER; MELZACK, 1999).

A partir daí faz-se necessário uma distinção entre dois termos, nocicepção e dor. A nocicepção refere-se somente à percepção do sinal no sistema nervoso central evocado pela ativação de receptores sensoriais especializados (nociceptores), provenientes de um tecido danificado (FÜRST, 1999). Por outro lado, a dor envolve tanto o componente sensorial, quanto o emocional, que se relaciona com condições motivacionais, psicológicas bem como experiências de vida de cada pessoa que normalmente se associam aos quadros dolorosos (COUTAUX *et al.*, 2005). A partir destes conceitos pode-se afirmar que a dor seria o termo mais adequado para o homem enquanto que nocicepção ou sensação nociceptiva seria mais indicada para modelos experimentais com animais (NOBACK *et al.*, 1996).

A hiperalgesia, outro termo importante, é uma alteração sensorial que se caracteriza por exacerbar a sensação dolorosa, ou seja, receptores respondem a estímulos nocivos de forma mais intensa produzindo mais dor, mediante a um estímulo nocivo. Isso ocorre devido à sensibilização dos nociceptores silenciosos, normalmente inativos, que são recrutados após algum dano tecidual e respondem a uma variedade de estímulos. Na clínica este termo também é conhecido como “dor anormalmente intensa”. Diferentemente de hiperalgesia, o termo alodinia é definido, segundo a IASP, como a dor decorrente de um estímulo normalmente não doloroso (DRAY; BEVAN, 1993; JULIUS; BASBAUM, 2001; LOESER; MELZACK, 1999; GUYTON; HALL, 2002).

Assim como outras modalidades sensoriais, a dor é necessária para a sobrevivência e manutenção da integridade do organismo. Entretanto quando esta se torna sustentada, acarreta sintomas secundários como ansiedade e a depressão,

diminuindo acentuadamente a qualidade de vida do indivíduo (HUNT; MANTYH, 2001).

Quando o estímulo nociceptivo, seja ele mecânico, químico ou térmico, ativa os nociceptores periféricos, o sinal é conduzido através dos neurônios primários até o corno dorsal da medula espinhal. Neste local, o neurônio primário realiza sinapse com o neurônio secundário que, cruzando a medula espinhal, envia a informação nociceptiva através de tratos nervosos específicos. Suas aferências realizam uma segunda sinapse com neurônios terciários no núcleo lateral e medial do tálamo. Por fim, estes neurônios enviam sinais ao córtex somatossensorial primário e secundário, envolvidos com localização, duração e intensidade do estímulo nociceptivo (FARQUHAR-SMITH, 2007; VANDERAH, 2007; MARCHAND, 2008).

Distribuídos de forma ubíqua no nosso organismo, os nociceptores são os responsáveis pela percepção do estímulo nocivo. Estes receptores são terminais periféricos de neurônios sensitivos primários cujos corpos celulares estão localizados nos gânglios da raiz dorsal ou nos gânglios trigêmeos. São distribuídos em três classes principais de acordo com os diferentes estímulos: (1) nociceptores térmicos (ativados por temperaturas extremas); (2) nociceptores mecânicos (ativados por pressão intensa aplicada na pele) e (3) nociceptores polimodais (ativados por estímulos mecânicos, químicos ou térmicos de alta intensidade). A sensibilização destes nociceptores causa uma redução do seu limiar de ativação e, em alguns casos, atividade espontânea.

Do ponto de vista fisiológico, a dor pode ser classificada em:

- a) nociceptiva: caracteriza-se por ser uma resposta fisiológica ao funcionamento normal tanto do sistema nervoso central (SNC) quanto do periférico (SNP), protegendo o organismo de um dano eminente (SALTER, 2005);
- b) inflamatória: está relacionada com processo inflamatório presente principalmente na dor crônica. Mediadores químicos liberados devido à injúria tissular ou da ativação do sistema imunológico são os responsáveis pela sensibilização dos nociceptores (FERREIRA, 1979; HANDWERKER, 1976; BASBAUM; JESSELL, 2000);

- c) neuropática: associada a um processamento somatossensorial anormal ao nível periférico ou central podendo ser iniciada após lesão nervosa, uso crônico de determinadas drogas ou associadas a algumas patologias como câncer, AIDS e diabetes (BARON, 2000);
- d) neurogênica: é aquela que ocorre com o dano diretamente sobre as inervações;
- e) psicogênica: é aquela que não possui causa orgânica, mas se expressa em consequências de problemas psicológicos (MENEZES, 1999).

A dor associada à inflamação é resultante de mudanças funcionais em neurônios aferentes (nociceptores). A sensibilização destes receptores é caracterizada pela diminuição do limiar de excitabilidade necessário para ativá-lo, além do aumento da atividade espontânea da célula nervosa e pelo aumento na frequência de disparo em resposta a estímulos acima do limiar (WALL; MELZACK, 1999). Alterações no microambiente da área lesada ocorrem devido à liberação de vários mediadores inflamatórios que promovem de forma sinérgica uma alteração no mecanismo de transdução periférica do estímulo nociceptivo aumentando a sensibilidade de transdução dos nociceptores levando ao aparecimento da dor inflamatória (BONICA *et al.*, 1990; MEYER; CAMPBELL; RAJA, 1994).

Dois grupos de mediadores inflamatórios são igualmente importantes na transmissão nociceptiva: aqueles que ativam diretamente os nociceptores e os que apenas sensibilizam estes receptores. As prostaglandinas, as aminas simpáticas (noradrenalina, adrenalina, dopamina), substância P, endotelinas e bradicinina representam o primeiro grupo; e óxido nítrico, fator de crescimento neural (NGF) e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ ) representam o segundo grupo de mediadores (TURNBACH; RANDICH, 2002; DOURSOUT; LIANG; CHELLY, 2003; CUNHA *et al.*, 1991).

### **1.1.3. Anti-inflamatórios e a busca de novos fármacos**

Todos os organismos vivos dependem da habilidade de se protegerem contra ação de patógenos exógenos e reparação de tecidos danificados resultante de uma infecção ou trauma (NATHAN; DING, 2010). Para tanto, tem-se o processo

inflamatório como primeira reação de defesa. Contudo há uma linha tênue entre os benefícios e os prejuízos que esta proteção pode acarretar (FOLEY, 2013). Atividade inflamatória excessiva leva a uma produção massiva de citocinas e outros mediadores, causando danos ao hospedeiro. Um quadro de inflamação patológica pode ser proveniente também de um defeito na via de regulação inflamatória, podendo levar a uma doença de caráter crônico. Uma terceira classe de doenças inflamatórias seria a resposta a uma reação inicial mal resolvida, gerando também a cronicidade culminando em danos a tecidos saudáveis. É o caso da artrite reumatoide e alguns tipos de diabetes. O acúmulo de sucessivas (auto)reações pode levar a doenças relacionadas ao envelhecimento como aterosclerose, resistência a insulina, câncer e enfermidades neurodegenerativas, como o Alzheimer (MCINNES; SCHETT, 2011; SCRIVO; VASILO, 2011; TABAS; GLASS, 2013).

Diante disso, uma variedade de agentes anti-inflamatórios está disponível no mercado para o tratamento e controle destas doenças. Essas drogas vão desde uma simples Aspirina®, introduzida em 1899 como a primeira droga potente contra doenças reumáticas, até a nova era de biofármacos anti-citocinas e inibidores de quinases provenientes da tecnologia do DNA recombinante. A problemática da utilização de anti-inflamatórios é que como a maioria deles agem inibindo a produção ou ação de mediadores químicos, interferem também nas outras ações que estas moléculas atuam para a homeostase do organismo (DINARELLO, 2010).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são as drogas mais comumente usadas no tratamento de doenças inflamatórias sendo eficientes em controlar dor, febre, vermelhidão e crescimento de edema (HALTER *et al.*, 2001). Eles agem interferindo na produção de mediadores inflamatórios provenientes do ácido araquidônico. Tais mediadores são produzidos, inicialmente pela ação catalítica da fosfolipase A<sub>2</sub> sobre fosfolipídios da membrana, liberando ácido araquidônico. Este por sua vez é convertido em metabólitos intermediários através da ação de enzimas chamadas ciclooxigenases (COX). Por último, prostaglandinas e tromboxanos são formados por ação de peroxidases (SÜLEYMAN; DEMIRCAN; KARAGÖZ, 2007).

Os AINEs agem inibindo a ação da COX. Existem duas isoformas principais de ciclooxigenases, uma constitutiva (COX-1) e uma induzível (COX-2), onde a indução da expressão é favorecida por fatores de crescimento e agentes pró-inflamatórios. As prostaglandinas produzidas constitutivamente pela COX-1 possuem

papel protetor do sistema gastrointestinal por reduzir a secreção de ácido gástrico, aumentar a espessura da mucosa, estimular a secreção de bicarbonato e aumentar o fluxo sanguíneo da mucosa. Assim, AINEs que inibem COX-1 de maneira mais acentuada que COX-2, como é o caso da indometacina, ibuprofeno e naproxeno, causam danos mais severos na mucosa gástrica. Em contrapartida, AINEs que inibem de maneira mais seletiva para COX-2, os chamados coxibes, tendem a provocar menos efeitos adversos (SÜLEYMAN; DEMIRCAN; KARAGÖZ, 2007). Porém, alguns estudos tem demonstrado que estas drogas podem resultar em problemas trombóticos e cardiovasculares. Tal efeito adverso parece estar relacionado com um distúrbio no balanço entre a ação pró-trombótica de tromboxano A<sub>2</sub> e a anti-trombótica da prostaglandina I<sub>2</sub>, já que inibidores de COX-2 não causam a inibição da produção de tromboxanos. Estes coxibes devem ser evitados em pacientes com histórico de quadros hipertensivos (MUKHERJEE, 2002).

Glicocorticóides são vastamente usados em muitas doenças crônicas como as auto-imunes. Injeções intra-articulares são comumente usadas para tratar a dor nas juntas osteo-artríticas e tendinites. Apesar de existirem muitos mecanismos pelos quais os corticoides inibem a inflamação, o principal é por reduzir a expressão gênica de citocinas. Estas drogas entram nas células e se ligam aos receptores citoplasmáticos de esteroides, translocam-se para o núcleo onde é reconhecido por sequências específicas do DNA. O principal efeito da ligação ao DNA é a supressão da transcrição por barrar a ativação de fatores de transcrição AP-1 e NF-κB. Tais fatores induzem a produção de basicamente todas as citocinas pró-inflamatórias (DINARELLO, 2010).

Apesar da grande efetividade dos glicocorticoides, a duração, dose e modo de aplicação deve ser cautelosa. Os efeitos colaterais da utilização destes fármacos variam de severidade, podendo ir desde simples mudanças na fisionomia, como telangiectasia e hipertricose, até problemas mais graves, como hemorragia gástrica. Uma combinação típica de efeitos causados pelo uso contínuo de glicocorticoides é o que acontece no caso da síndrome de Cushing, caracterizada por uma série de sinais clínicos que incluem face arredondada, obesidade, hirsutismo, osteoporose, diminuição de crescimento e intolerância a glicose. Portanto, tais drogas anti-inflamatórias devem ser administradas com cautela, levando sempre em consideração a relação risco:benefício de sua utilização (DINARELLO, 2010).

Devido aos avanços nas técnicas do DNA recombinante, um grande número de proteínas terapêuticas (biofármacos) tem sido produzidos e vastamente utilizados (LEADER; BACA; GOLAN, 2007). Dentre estas drogas, muitas tem propriedade anti-inflamatória. Estes agentes agem principalmente reduzindo a atividade de citocinas específicas ou seus receptores, como é o caso do anticorpo anti-TNF- $\alpha$ , Infliximab. Porém, mesmo sendo moléculas mais específicas que os anti-inflamatórios de baixa massa molecular, tais biofármacos também apresentam efeitos adversos, sendo o mais importante a redução da defesa do hospedeiro a infecções. Quando detectadas precocemente, estas infecções podem ser efetivamente tratadas com antibióticos. Contudo, o uso contínuo de alguns biofármacos pode acarretar em doenças oportunistas sérias como é o caso da leucoencefalopatia multifocal progressiva causada por um vírus que é uma doença mais frequentemente observada em pacientes com a síndrome da imunodeficiência humana (DINARELLO, 2010).

A migração de neutrófilos da corrente sanguínea para o tecido representa um processo chave durante a inflamação e requer múltiplas etapas. Cada etapa deste processo é regulada por citocinas/quimiocinas e por vários tipos de moléculas de adesão, incluindo selectinas, integrinas e imunoglobulinas. As selectinas são uma família de proteínas transmembranares possuindo um domínio extracelular capaz de se ligar a carboidrato de glicoproteínas sialiladas ou ricas em mucina. Em mamíferos existem três tipos de lectinas e comum a todas elas é o fato de mediar o rolamento inicial de leucócitos da corrente sanguínea com as células endoteliais da parede dos vasos, iniciando o processo de migração. A inibição dessa interação de selectinas e seus ligantes específicos desfaz a cascata de recrutamento de leucócitos para o local da inflamação e conseqüentemente resultando em alívio de doenças causadas pela reação imunológica indesejada (alergia, psoríase, esclerose múltipla ou artrite reumatoide). Assim interferência farmacológica na cascata de recrutamento de leucócitos parece ser uma estratégia promissora contra doenças inflamatórias (IMPELLIZZERI; CUZZOCREA, 2014).

Uma variedade de agentes dirigidos às selectinas, incluindo carboidratos mimetizantes e anticorpos anti-selectinas, foram produzidos por algumas empresas farmacêuticas para o tratamento de doenças inflamatórias. Contudo, enquanto estes inibidores funcionais de selectinas apresentam resultados promissores em vários modelos de animais, ao transfirirem para tratamento efetivo em humanos a resposta

não foi a esperada. De fato, somente uma única terapia direcionada a inibição de selectinas, chamada de Bimosimose, demonstrou sucesso clínico (BEEH *et al.*, 2006; IMPELLIZZERI; CUZZOCREA, 2014). Portanto, como selectinas são alvos atrativos para intervenções terapêuticas contra inflamação, a busca de novas drogas que interfiram na ação destas moléculas é bastante promissora.

Produtos naturais, com seu grande arsenal de compostos diversificados, merecem destaque na busca incessante de novas drogas. Em números, por exemplo, das 1355 novas entidades químicas aprovadas desde 1981 até 2010, cerca de 70% são derivadas ou baseadas de produtos naturais. Portanto estes recursos tem um papel dominante na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de diversas doenças (GAUTAM; JACHAK, 2009; NEWMAN; CRAGG, 2012).

Dentre esses recursos naturais as plantas medicinais são as mais utilizadas. Medicamentos baseados em plantas, inicialmente dispensados na forma de drogas brutas como tinturas, chás, compressas, pós e outras formulações, agora servem como base para a descoberta de novas drogas, inclusive fármacos para fornecer alívio à dor e inflamação em diversas enfermidades crônicas (GAUTAM; JACHAK, 2009).

## **1.2. Lectinas de plantas**

Lectinas são definidas como proteínas que reconhecem e se ligam preferencialmente aos complexos de carboidratos como glicolipídeos e glicoproteínas (MODY *et al.*, 1995; GORELIK *et al.*, 2001; BIES *et al.*, 2004; MINKO, 2004). O termo lectina é derivado da palavra *legere*, originária do Latim, que quer dizer “escolher”, “selecionar” e tem sido utilizada para abranger todas as proteínas que se ligam de maneira específica a carboidratos, mas que não são de natureza imune. Tal interação pode ser através de pontes de hidrogênio ou forças de Van Der Waals (SHARON; LIS, 2004).

A particular interação dessas proteínas a carboidratos pode ser tão específica quanto à ligação antígeno-anticorpo ou enzima-substrato (MINKO, 2004). Lectinas não se ligam apenas a oligossacarídeos complexos de células, elas podem também se ligar a monossacarídeos livres, porém a interação a estes últimos é

relativamente mais fraca, com constantes de dissociação na ordem de micromolar a milimolar (BOUCKAERT *et al.*, 2005; ROBINOVICH *et al.*, 2007).

O início da “lectinologia” data de antes de 1888 quando um estudante chamado Herrmann Stillmark descreveu pela primeira vez a propriedade aglutinante da ricina, uma lectina extremamente tóxica proveniente de sementes de *Ricinus comunis* (PEUMANS e VAN DAMME, 1995; BIES *et al.*, 2004; SHARON; LIS, 2004). Lectinas foram inicialmente descritas em plantas, porém, nos anos subsequentes, múltiplas lectinas foram isoladas de microorganismos e também em animais. Hoje, sabe-se que essas proteínas são ubíquas, com ampla distribuição na natureza, tendo sido encontradas em bactérias, fungos, algas, vegetais superiores, vertebrados, invertebrados e vírus (GHAZARIAN *et al.*, 2011). Curiosamente, lectinas de plantas e animais, mesmo não mostrando homologia nas suas estruturas primária, demonstram semelhança na especificidade da ligação a determinados carboidratos. Isto sugere que genes que codificam lectinas podem ter co-evoluído, destacando assim a importância das interações lectina-carboidrato em sistemas vivos (GORELIK *et al.*, 2001; GHAZARIAN *et al.*, 2011).

Lectinas de plantas são as mais estudadas devido às suas importâncias econômica e nutricional e também por serem de fácil isolamento através de cromatografia de afinidade (LIS e SHARON, 1998). Geralmente, as lectinas vegetais são mais abundantes em sementes, porém elas são também encontradas em diferentes tecidos como raízes, folhas, caule, flores, bulbos e rizoma (BROEKAERT; ALLEN; PEUMANS, 1987; PEUMANS *et al.*, 1997; RATANAPO; NGAMJUNYAPORN; CHULAVATNATOL, 1998; VAN DAMME *et al.*, 2000; VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004).

Considerando a estrutura global das lectinas, elas podem ser divididas dentro de quatro classes principais: merolectinas, que são proteínas que tem um único domínio ligante a carboidrato; hololectinas, compreendendo todas as lectinas com dois ou mais sítios de ligação a carboidrato; quimerolectinas, proteínas consistindo de um ou mais domínios lectínicos adicionado de outro sítio catalítico em um domínio distinto daquele(s) ligante(s) a carboidrato; superlectina, que são lectinas que possuem dois ou mais domínios ligantes a carboidratos, sendo que esses domínios têm especificidade por açúcares diferentes (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; VAN DAMME *et al.*, 1998).

Apesar das lectinas de plantas serem consideradas como um grupo muito complexo e heterogêneo é possível subdividir estas proteínas em sete famílias estruturalmente e evolucionariamente relacionadas: lectinas de leguminosas, lectinas ligantes à quitina, lectinas relacionadas à jacalina, lectinas RIP tipo 2, lectinas da família amarantina e lectinas do floema das curcubitáceas (MURDOCK; SHADE, 2002).

Lectinas ligantes à quitina são proteínas que contêm um ou mais domínios heveínicos. O termo heveína refere-se a um polipeptídeo de 43 resíduos de aminoácido, encontrado no látex da seringueira (*Hevea brasiliensis*). Estas lectinas são ubíquas em plantas e se ligam especificamente ao carboidrato *N*-acetil-*D*-glucosamina ou ao biopolímero (quitina) formado por resíduos deste mesmo carboidrato (RAIKHEL; LEE, 1993; ASENSIO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2006). Dentre as lectinas ligantes à quitina destacam-se aquelas encontradas em sementes de *Chelidonium majus*, *Phytolacca americana*, *Urtica dioica* (UDA), gérmen de trigo (WGA), *Ozyra sativa*, *Triticum aestivum*, *Solanum tuberosum*, *Lycopersicon esculentum*, dentre outras (RAIKHEL; LEE, 1993; CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002; TRINDADE *et al.*, 2006).

### **1.2.1. Aplicações farmacológicas de lectinas de plantas**

Carboidratos, na forma de glicoproteínas, glicolipídeos e polissacarídeos são importantes moléculas sinalizadoras. Geralmente, encontram-se na membrana celular e possuem o poder de codificar informações biológicas, podendo atuar de forma determinante no reconhecimento em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos (MISLOVICOVÁ *et al.*, 2009). Devido à habilidade de se ligar e distinguir carboidratos determinantes em células humanas, as lectinas se tornaram alvo de grandes descobertas de interesse clínico (SHARON, 2007 *apud* LIU;BIAN; BAO, 2010).

Nas últimas duas décadas, lectinas de plantas tem sido utilizadas como ferramenta de reconhecimento para diferenciar tumores malignos de benignos e associar o grau de glicosilação à metástase (GORELIK; GALILI; RAZ, 2001; LIU *et al.*, 2009). Enquanto isso, uma abordagem anticâncer vem sendo atribuída a algumas lectinas vegetais, além de serem indicadas como adjuvantes para reduzir efeitos indesejáveis de quimioterápicos e radioterápicos (SHUMACHER *et al.*, 2003; VALENTINER *et al.*, 2003). Recentemente, muitos estudos tem apresentado atividade

antitumoral de lectinas de plantas em uma variedade de células malignas, e o mais importante, algumas delas já se encontram em fases pré-clínica e clínica para testes de novos fármacos (LIU *et al.*, 2013). Algumas lectinas já bem conhecidas como a de visco branco (ML), ricina e aglutinina de gérmen de trigo (WGA) tem sido reportadas pelas suas notáveis atividades antitumoral, através da indução de apoptose em células cancerígenas. Adicionalmente a estas, temos a lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA) e de *Phaseolus coccineus* (PCL) que induzem autofagia após serem internalizadas em células tumorais (LYU; CHOI; PARK, 2002; PLATTNER *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2009; LIU; MIN; BAO, 2009).

O uso de lectinas tem promovido avanços na endocrinologia. Como exemplo, pode ser citado a promoção da absorção oral da insulina via lipossomos acoplados a lectina, como a WGA, pela combinação específica ao sítio de interação a carboidrato desta proteína a células da membrana do trato gastrointestinal (ZHANG *et al.*, 2005). Foi relatada também a fosforilação do receptor para insulina, induzida por lectinas vegetais glucose/manose específicas *in vitro* (CAVADA *et al.*, 2003).

Outra participação dessas proteínas é na contratilidade de músculo liso, pois o tratamento de coelhos com a lectina de *Ricinus communis* (ricina) aumentou significativamente a contração induzida por serotonina e histamina (ZHANG; HSU; ROBINSON, 1994). Posteriormente, foi demonstrado que a WGA e a lectina da alga vermelha *Bryothamnion triquetrum* estimulam a liberação do fator relaxante derivado do endotélio (KLEHA; DEVESLY; JOHNS, 1991; LIMA *et al.*, 2004).

No tocante às ações na inflamação e sistema imune, experimentos *in vivo* demonstraram que lectinas de plantas podem exercer ações pró ou anti-inflamatórias dependendo da via em que são administradas (ALENCAR *et al.*, 2004). Estes efeitos geralmente são oriundos da ativação ou inibição da migração de neutrófilos, via interação entre o domínio ligante a carboidrato da lectina e resíduos de carboidratos presentes na membrana das células (FIGUEIREDO *et al.*, 2009).

Lectinas da subtribo Diocleinae foram capazes de provocar mitose em linfócitos humanos e induzir a produção de interferon- $\gamma$  (BARRAL-NETO *et al.*, 1992; MACIEL *et al.*, 2004), além de estimular liberação de histamina por mastócitos peritoneais de ratos (GOMES *et al.*, 1994). Foi demonstrado também que a lectina de soja e das leguminosas *Dioclea grandiflora*, *Canavalia brasiliensis* e *Vaitarea macrocarpa* induziram migração de leucócitos e formação de edema de pata em ratos

(BENTO *et al.*, 1993; ALENCAR *et al.*, 2003, 2004, 2007; FREIRE *et al.*, 2003; ALENCAR *et al.*, 2005a,b,c; COELHO *et al.*, 2006), ou seja, estimulam a ativação do sistema imune inato, o que vislumbra a melhora do tratamento de infecções, principalmente em pacientes imunossuprimidos.

Apesar do potencial pró-inflamatório bem comprovado, resultante da administração local de lectinas, algumas dessas proteínas, quando administradas endovenosamente, apresentam potente ação anti-inflamatória (ASSREUY *et al.*, 1997; ALENCAR *et al.*, 2005; SANTI-GADELHA *et al.*, 2006; MOTA *et al.*, 2006). É o caso das lectinas isoladas de *Dioclea virgata* e *Lonchocarpus sericeus* que foram capazes de inibir a migração neutrofílica induzida por carragenina em ratos (ALENCAR *et al.*, 1999). Algumas lectinas como a de *Cymbosema roseum*, uma proteína ligante a manose possui tanto ação pró-inflamatória como anti-inflamatória, dependendo da via a qual é administrada (ROCHA *et al.*, 2011).

Em estudos utilizando microscopia intravital, foi demonstrado que o potencial anti-inflamatório da lectina de *L. sericeus* é, em parte, devido à habilidade em inibir o rolamento e adesão dos leucócitos no endotélio vascular *in vivo* (NAPIMOGA *et al.*, 2007). Outros estudos, utilizando a mesma metodologia, demonstraram também que a ação anti-inflamatória das lectinas de *Canavalia grandiflora* e *Luetzelburgia auriculata* está intimamente relacionada com a inibição do rolamento e adesão dos neutrófilos ao endotélio vascular (NUNES *et al.*, 2009; ALENCAR *et al.*, 2010).

Alguns estudos apontam que lectinas que possuem como açúcares ligante *N*-acetil-D-glucosamina (GlycNac) e glucose-manose inibem a infiltração neutrofílica em diferentes modelos de inflamação (ASSREUY *et al.*, 1988; ASSREUY *et al.*, 1997; ALENCAR *et al.*, 1999). Experimentos realizados por Alencar e colaboradores (1999), para estudar o papel de resíduos de açúcares no recrutamento de leucócitos, mostraram que glicoconjugados contendo GlycNac são essenciais para a migração leucocitária. Adicionalmente, foi relatado que algumas lectinas de plantas com ligação específica a esse carboidrato inibiram a secreção de histamina de mastócitos *in vitro* (BACH e BRASHLER, 1975; MATSUDA *et al.*, 1994). Lectina isolada de sementes de *Araucaria angustifolia*, que possui como carboidrato ligante específico o GlycNac, exerceu efeito anti-inflamatório, atuando como antagonista de receptores de membrana de mastócitos, inibindo, assim, a liberação do conteúdo de seus grânulos.

Porém, essa mesma proteína exerceu efeito pró-inflamatório quando injetada subcutaneamente, atuando como agonista dos receptores de membrana dos mastócitos e ativando a liberação de mediadores inflamatórios (MOTA *et al.*, 2006).

Ao que se refere à nocicepção, os trabalhos relacionados às lectinas com atividade antinociceptiva geralmente estão ligados à inibição da inflamação. Lectinas de *C. grandiflora* e *L. sericeus* e *Parkia biglobosa* possuem atividade antinociceptiva relacionada à inibição do influxo de neutrófilos (NAPIMOGA *et al.*, 2007; NUNES *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2013). Contudo, recentemente, foi mostrado que uma lectina isolada de sementes de *C. brasiliensis* (ConBr) apresentou efeito antinociceptivo de origem tanto periférica quanto central, envolvendo a participação do sistema opióide via domínio lectínico (PIRES *et al.*, 2011). Portanto, lectinas são promissores agentes anti-inflamatórios e antinociceptivos que ainda merecem estudos a fim de esclarecer mecanismos de ação e potencial utilização para fins terapêuticos.

### 1.3. *Moringa oleifera* Lamarck: Considerações gerais

*Moringa oleifera* é a espécie mais amplamente cultivada de uma família monogenética, a *Moringaceae* que é nativa das proximidades do Himalaia na Índia, Paquistão, Bangladesh e Afeganistão. Esta árvore de rápido crescimento foi utilizada por antigas civilizações, como romanos, gregos e egípcios; hoje esta planta é vastamente cultivada e tornou-se naturalizada em várias localidades nos trópicos. Trata-se de uma árvore decídua que geralmente cresce até 10 a 12 m de altura. Na América tropical, onde foi introduzida como planta ornamental, é uma planta de porte arbóreo e de tronco único (FIGURA 2).

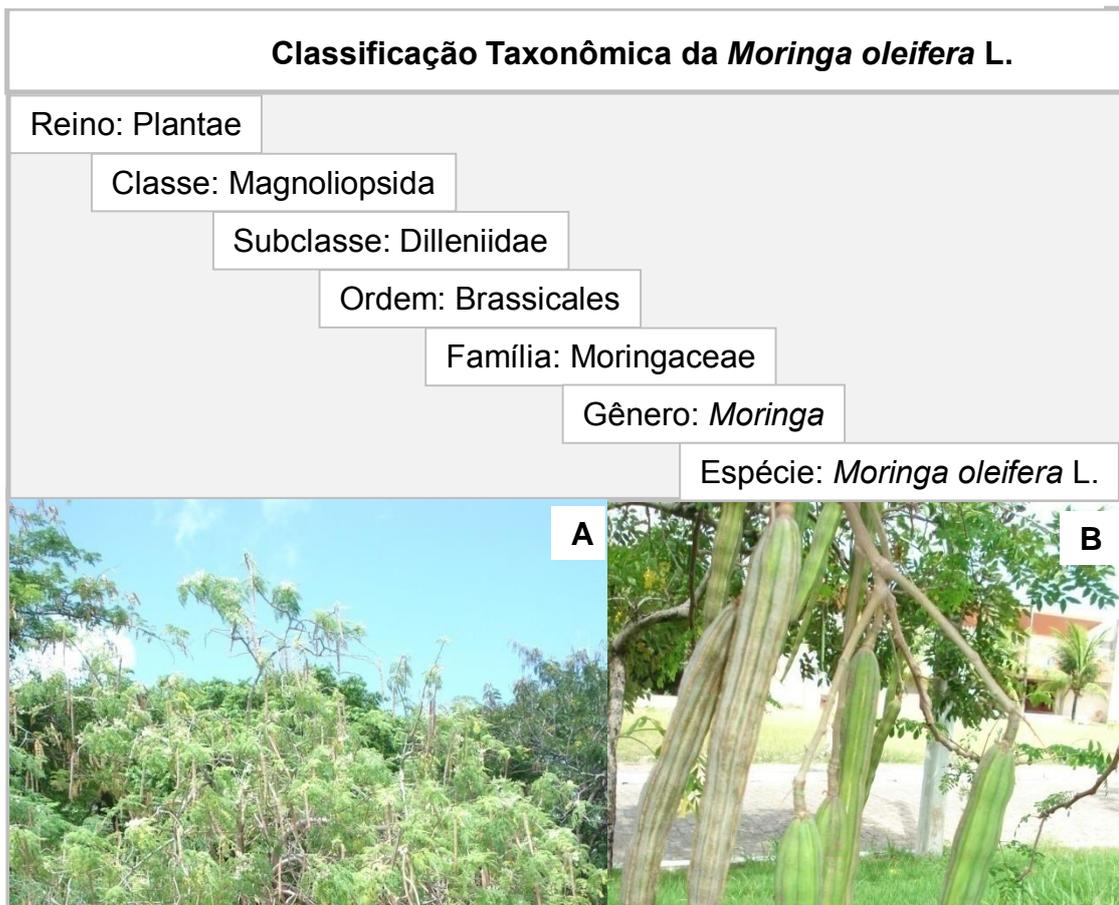
No Brasil, ela aparece bem menor do que na Índia, possuindo caule delgado, muitas vezes único e copa aberta em forma de guarda-chuva (SILVA e KERR, 1999; LORENZI e MATOS, 2002; CYSNE, 2006).

O caule é acinzentado e, quando injuriado, exsuda um látex branco. Na medula central há uma grande quantidade de mucilagem, rica em arabinose, galactose e ácido glicurônico. As folhas são verdes-pálida, decíduas alternadas, pecioladas e bipinadas ou mais comumente tripinadas, medindo 45 cm de comprimento, contendo sete folíolos pequenos em cada pina. Os folíolos laterais possuem formas elípticas, enquanto que os terminais são ligeiramente maiores que

os laterais. O mesófilo contém cristais de cálcio (CÁCERES *et al.*, 1992). A raiz assemelha-se na aparência e no sabor ao rábano. A casca da raiz é espessa, mole e reticulada, de cor pardo-clara, externamente, e branca, internamente, lenho mole, poroso e amarelado (CÁCERES *et al.*, 1992).

As flores são divididas em cálice e corola. São monóclinas, perfumadas, de cores creme ou branca, estando agrupadas em inflorescências terminais do tipo cimosa, as chamadas panículas. Em lugares onde o índice pluviométrico é maior do que 600 mm por ano, como nas ilhas do Caribe, as árvores estão sempre floridas; caso contrário, a planta só se reproduz na estação chuvosa. Os frutos são pêndulos lineares, possuindo cor verde a marrom esverdeada, formato triangular e se quebra longitudinalmente em três partes quando seco. Geralmente, possuem de 20 a 50 cm de comprimento e armazenam de 10 a 20 sementes. Estas são globóides, escuras por fora e contêm no seu interior uma massa branca e oleosa. O núcleo é encoberto por uma concha sendo trialadas, oleaginosas e medindo até 1 cm de diâmetro (PALANISAMY e KUMERASAN, 1985; LORENZI e MATOS, 2002; CYSNE, 2006).

**Figura 2 – Classificação taxonômica de *Moringa oleifera* Lamarck**



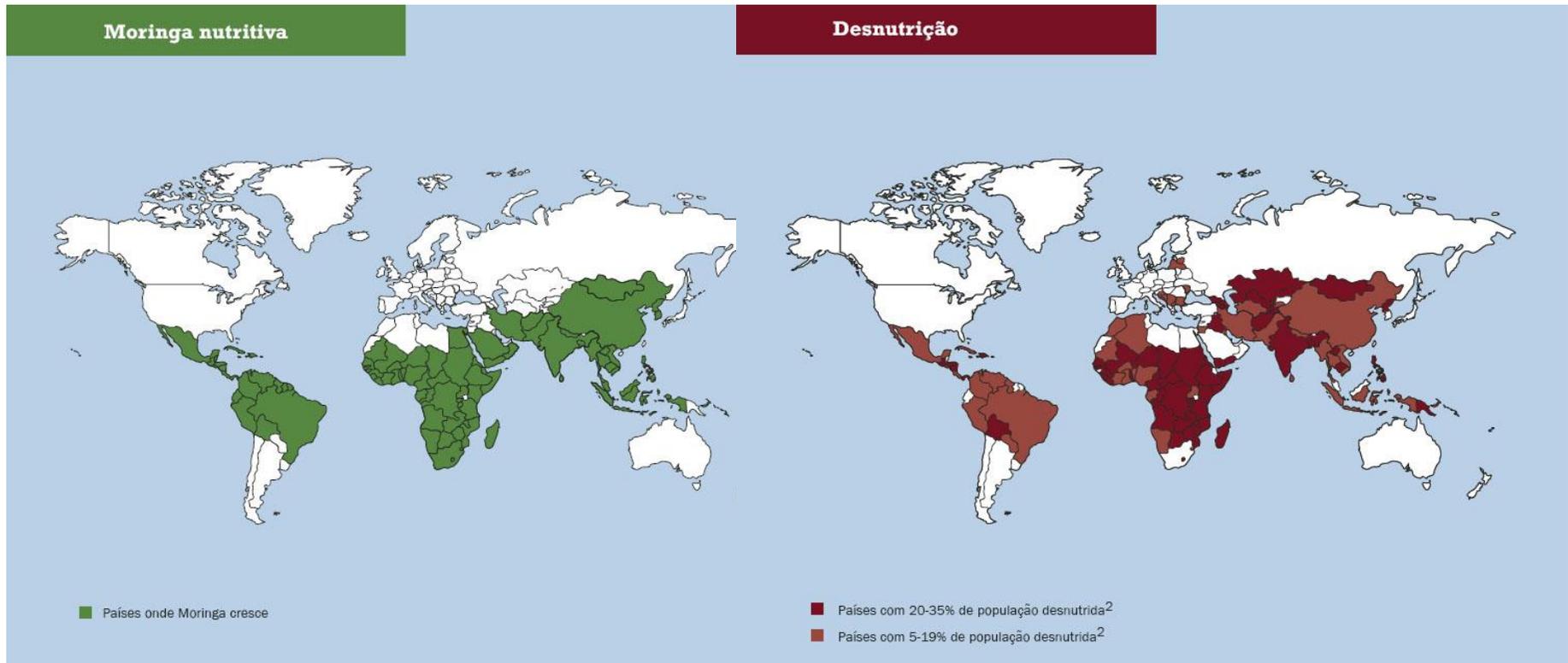
**C****D**

Fonte: PEREIRA, 2010. (A) Árvore de *M. oleífera*; (B) Frutos imaturos; (C) Frutos maduros; (D) Sementes aladas.

Ao longo dos séculos a *M. oleifera* tem sido utilizada pela medicina tradicional e por indústrias. É uma cultura importante na Índia, Etiópia, Filipinas, Sudão e está sendo cultivada na África do Sul, Ásia tropical, América Latina, Flórida e em Ilhas do Pacífico. Todas as partes desta árvore são comestíveis e têm sido consumidas por seres humanos (RAMACHANDRAN *et al.*, 1980; WARDHWA *et al.*, 2013). De acordo com Foidl e colaboradores (2001), os muitos usos para Moringa incluem: produção de biomassa, forragem para animais (folhas e sementes), biogás (a partir de folhas), agente de limpeza doméstica (folhas trituradas), corante azul (madeira), barreira (árvores vivas), fertilizantes (semente), nutriente foliar (suco processado das folhas), adubo verde (de folhas), goma (a partir de troncos de árvores), clarificador de mel e de caldo de cana-de-açúcar (sementes em pó), produção de mel (néctar floral), uso medicinal (todas as partes da planta), plantações ornamentais, biopesticida (incorporação ao solo de folhas para evitar tombamento de plântulas), celulose (madeira), corda (casca), tanino para tratamento de peles de bronzeamento (casca e goma) e, finalmente, purificação de água (sementes em pó). Óleo de semente de Moringa (rendimento de 30-40%, em peso), também conhecido como óleo de Ben, tem sabor adocicado, não é aderente nem seca com facilidade, além de ser resistente ao ranço. Este óleo é geralmente usado em saladas, lubrificação da máquina e na fabricação de perfume e produtos para os cabelos.

Análises químicas mostraram que suas folhas são particularmente ricas em potássio, cálcio, fósforo, ferro, vitaminas A e D, aminoácidos essenciais, bem como antioxidantes incluindo  $\beta$ -caroteno, vitamina C e flavonoides (BENNET *et al.*, 2003; ASLAM *et al.*, 2005; MANGURO; LEMMEN, 2007; AMAGLO *et al.*, 2010; GOWRISHANKAR *et al.*, 2010). Diversos e recentes trabalhos tem ressaltado a importância desta planta na remediação da desnutrição e de uma gama de doenças em populações carentes. “Na internet, variáveis como, “Árvore do Milagre”, “Árvore da Vida”, Melhor Amiga da Mãe”, “Presente de Deus dado aos Homens” e “Salvadora dos Pobres” são utilizadas para se referir a *Moringa oleifera* (MBIKAY, 2012). Talvez essas denominações estejam relacionadas a localização geográfica onde esta planta é encontrada (FIGURA 3): em países subdesenvolvidos das regiões tropicais e subtropicais (MBIKAY, 2012).

Figura 3 - Associação entre os países que têm maior índice de desnutrição e aqueles onde a Moringa cresce



Fonte: United Nations World Food Programme, 2004.

No Brasil, onde foi introduzida por volta de 1950, é encontrada na região Nordeste, principalmente nos estados do Maranhão, Piauí e Ceará, sendo conhecida popularmente como lírio-branco, quiabo de quina ou simplesmente moringa (AMAYA et al., 1992; MATOS, 1998; CYSNE, 2006).

Apesar dos esforços para difundir o uso e o cultivo de *M. oleifera* com finalidade nutricional (tendo em conta o alto teor de proteínas, vitaminas, sais minerais e a baixa toxicidade das sementes e folhas), a principal utilização desta planta no Brasil consiste principalmente da sua propriedade purificadora de água, sendo bastante propagada em todo o semiárido nordestino (GALLÃO; DAMASCENO; BRITO, 2006; FERREIRA et al., 2008).

Farinha de sementes de *M. oleifera* é tradicionalmente usada como um coagulante para purificação de água. No Sudão, mulheres da zona rural utilizam o extrato bruto das sementes para tratar a água altamente turva do rio Nilo no lugar de alume (um sal de alumínio usado comumente no tratamento de água), devido ao medo de que esse reagente cause distúrbios gastrointestinais e doença de Alzheimer. Uma ou duas sementes são capazes de tratar um litro de água, reduzindo a turbidez em 92 a 99%.

Acredita-se que os agentes responsáveis pela coagulação sejam proteínas homodiméricas catiônicas de massa molecular em torno de 13 kDa e ponto isoelétrico entre 10 e 11 (NDABIGENGESERE et al., 1995). Gassenschmidt e colaboradores (1995) isolaram uma proteína catiônica de sementes de *M. oleifera*, com massa molecular aparente de 6,5 kDa, rica em resíduos de arginina e prolina e possuindo ponto isoelétrico em torno de 10. Essa proteína mostrou atividade coagulante, cujo mecanismo de ação pode ser explicado pela alta densidade de cargas dessa proteína. Em 2005, foi reportado que frações enriquecidas de proteínas coagulantes de sementes de *M. oleifera* foram capazes de coagular material em suspensão, além de agregar bactérias do tipo *Escherichia coli* e *Bacillus thurigiensis*, inibindo o crescimento de tais microorganismos. Tais proteínas permaneceram ativas quando foram aquecidas a 96 °C, por 5 horas (GHEBREMICHAEL et al., 2005). Uma outra proteína coagulante foi isolada a partir de extrato salino de sementes de *M. oleifera* chamada de cMoL, mostrou atividade hemaglutinante quando incubada com eritrócitos de coelhos e humanos. PAGE-SDS mostrou que cMoL possui massa molecular aparente de 26,5 kDa e em eletroforese nativa básica foi detectada como

única banda. Esta proteína além de possuir atividade coagulante similar ao sulfato de alumínio manteve-se ativa após um aquecimento a 100 °C, por 7 horas (SANTOS *et al.*, 2009). Em nosso grupo de estudo foi isolada uma proteína ligante a quitina de sementes de *M. oleifera*, com propriedade coagulante chamada de *Mo-CBP*<sub>3</sub>. Esta lectina além de possuir a propriedade purificadora de água mostrou uma potente atividade antifúngica utilizando o fungo fitopatogênico *Fusarium solani*, mostrando-se fungicida na concentração de 0,1 mg/mL. Este estudo é pioneiro em relacionar as proteínas coagulantes da Moringa com um possível envolvimento na defesa da planta contra fitopatógenos (GIFONI *et al.*, 2012).

### **1.3.1. Potencial farmacológico da *M. oleifera***

*M. oleifera* também possui numerosos usos farmacológicos, reconhecidos por sistemas milenares de medicina como a Ayurvédica e Unani e corroboradas pela comunidade científica (MUGHAL; SRIVASTAVA; IQBAL, 1999; FERREIRA *et al.*, 2008).

A combinação das atividades diurética, hipocolesterolêmica e hipotensiva faz com que várias partes dessa planta sejam importantes ferramentas no tratamento e prevenção de desordens cardiovasculares (ANWAR *et al.*, 2007). Compostos ativos isolados do extrato etanólico das folhas foram capazes de diminuir a pressão sanguínea em ratos, mediada possivelmente por antagonismo aos canais de cálcio (GILANI *et al.*, 1994). Extratos etanólico e aquoso dos frutos também tiveram pronunciado efeito hipotensor (FAIZI *et al.*, 1995). Outros estudos mostram que raízes, folhas, flores, látex e infusão aquosa de sementes possuem atividade diurética, que geralmente são usadas como um auxiliar para o tratamento da hipertensão (MORTON, 1991; CÁCERES *et al.*, 1992).

O extrato aquoso das folhas de *M. oleifera* foi capaz de prevenir a formação de placas ateroscleróticas, bem como mostrou atividade antioxidante e hipolipidêmica em coelhos alimentados com dieta rica em colesterol (CHUMARK *et al.*, 2008). Estudos com ratos albinos alimentados com extrato metanólico de folhas (150, 300 e 600 mg/kg, v.o.) juntamente com dieta hiperlipídica por 30 dias mostraram redução dos níveis de colesterol, triacilglicerídeos, VLDL, LDL e índice aterogênico, mas não elevou os níveis de HDL, quando comparado com o grupo controle, com dieta rica em

colesterol. Além disso, *Moringa oleifera* aumentou a excreção fecal de colesterol. Essa atividade hipolipidêmica parece estar relacionada com a inibição da HMG-CoA redutase, uma enzima que participa da síntese de colesterol no fígado (JAIN *et al.*, 2010). Tem sido reportado também que os frutos de *M. oleifera* foram capazes de diminuir os níveis de fosfolipídeos, triglicerídeos e lipoproteínas de baixa densidade (LDL), além de aumentar os níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL), reduzindo a quantidade de lipídios no fígado, coração e aorta de coelhos hipercolesterolêmicos, podendo ser usados na prevenção de aterosclerose (MEHTA *et al.*, 2003).

Folhas de *M. oleifera* já eram tradicionalmente usadas para o tratamento de diabetes *mellitus*. Efeito hipoglicemiante foi demonstrado quando o extrato aquoso das folhas foi capaz de reduzir a glicose no sangue de ratos com diabetes grave, subgrave e leve a níveis normais (JAISWAL *et al.*, 2009). Como o dano oxidativo é um fator etiológico crucial para doenças crônicas como diabetes, a atividade hipoglicemiante parece estar relacionada com a propriedade antioxidante deste extrato já que enzimas responsáveis pela eliminação de radicais livres (como catalase e superóxido dismutase) encontravam-se com suas atividades aumentadas em ratos diabéticos tratados com as folhas de moringa (JAISWAL *et al.*, 2013). Adicionalmente, esse mesmo extrato preveniu a disfunção da retina em ratos diabéticos (GUPTA *et al.*, 2012). N-benzil tiocarbamato, N-benzil carbamato, benzil nitrila e um benzil éster isolados de extrato metanólico dos frutos também apresentaram atividade hipoglicemiante estimulando significativamente a liberação de insulina em células  $\beta$  do pâncreas de roedores. (FRANCIS *et al.*, 2004 ).

Fracionamento de extrato etanólico de folhas de *Moringa oleifera* resultou em isolamento de quatro compostos com atividade hipotensora e bradicárdica (GILANI *et al.*, 1999). Recentemente foi isolado um alcaloide a partir de folhas de moringa e este mostrou efeito cardioprotetor em estudos *in vitro* e *in vivo*, utilizando isoproterenol como agente cardiotóxico (PANDA *et al.*, 2013).

Atividade antiespasmódica foi encontrada para raízes e folhas de *M. oleifera*, fornecendo base farmacológica ao tradicional uso desta planta para distúrbios da motilidade gastrointestinal (CÁCERES *et al.*, 1992; GILANI *et al.*, 1994). Efeito antiulcerogênico foi encontrado para extratos metanólico e aquoso de folhas (PAL; MUKHERJEE; SAHA, 1995). Extrato etanólico da casca das raízes de moringa

apresentou potente atividade antiulcerogênica via oral em ratos, utilizando modelos de úlcera gástrica induzida por etanol ou por ligadura do piloro (CHOUDHARY; BODAKHE; GUPTA, 2013).

Foi reportado também atividade hepatoprotetora para raízes e folhas (PAL; MUKHERJEE; SAHA, 1995; RUCKMANI *et al.*, 1998). Nos extratos aquoso e alcoólico de flores de *M. oleifera* foi encontrado quercetina, um flavonoide responsável pelo potente efeito hepatoprotetor (GILANI *et al.*, 1994; RUCKMANI *et al.*, 1998). Recentemente, foi reportado que extrato alcoólico de sementes de *M. oleifera* foi capaz de inibir injúria e fibrose em fígados de ratos por um mecanismo relacionado às propriedades antioxidante e anti-inflamatória, além da habilidade em atenuar a ativação das células armazenadoras de gordura no fígado (HAMZA, 2010).

Makonnen, Hunde e Damecha (1997) reportaram que folhas de *M. oleifera* possuem potencial atividade antitumoral. Foram encontrados fitoquímicos promissores para esse tipo de atividade, como o isotiocianato, que foi capaz de inibir a ativação do vírus Epstein-Barr, promotor de tumor (MURAKAMI *et al.*, 1998). Isotiocianato também é conhecido como indutor de enzimas protetoras contra o câncer, principalmente da mama (ZHANG, 1994). Recentemente, um estudo feito com extrato aquoso de folhas mostrou forte atividade antiproliferativa e indutora de apoptose utilizando linhagem de células tumorais KB, indicando ser uma potente ferramenta na prevenção contra o câncer (SREELATHA *et al.*, 2011). As folhas também apresentaram potente atividade antiproliferativa em células cancerígenas do pâncreas, através da inibição do fator de transcrição pró-inflamatório NF- $\kappa$ B, além de aumentar a eficácia de quimioterápicos como cisplatina quando administrado concomitantemente (BERKOVICH *et al.*, 2013).

A utilização de *M. oleifera* contra doenças infecciosas da pele e de mucosas já é bem conhecida. Há relatos de pessoas na China e em Taiwan que utilizaram, com sucesso, as sementes no tratamento de dermatoses fúngicas como “pé-de-atleta” e “tinea” (CHUANG *et al.*, 2007). Usos similares foram relatados na Índia, Paquistão e Sudão (DASTUR, 1977; RAMACHANDRAN; PETER; GOPALAKRISHNAN, 1980; JAHN; MUSNAD; BURGSTALLER, 1986). Estudos apontam que células do dermatófito *Trichophyton rubrum* (fungo causador de “pé-de-atleta”), tratadas com extrato etanólico de sementes de *M. oleifera*, após 24 horas, apresentaram uma

ruptura na membrana plasmática e danos nos componentes intracelulares com consequente morte celular (CHUANG *et al.*, 2007).

*M. oleifera* também é conhecida na medicina popular por tratar várias indisposições relacionadas à dor e inflamação. Gupta, Mazumder e Chakrabarti (1999) mostraram que o extrato metanólico de raízes de *M. oleifera* foi capaz de deprimir o sistema nervoso central, causando analgesia e potencializando o efeito analgésico da morfina. Foi encontrado também um raro dipeptídeo (acetato de aurantiamida) e um derivado de ureia (1,3-dibenzil ureia) responsáveis pelas atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato alcoólico das raízes. Tais fitoquímicos exerceram suas atividades via controle de ativação dos mastócitos, inibindo a produção de TNF- $\alpha$  e IL-2 em condições inflamatórias (SASHIDHARA *et al.*, 2009). Extrato metanólico das raízes e folhas, separadamente ou em conjunto, foram capazes de reduzir a hiperalgesia térmica e mecânica em modelo de artrite induzida por adjuvante completo de Freund em ratos, mostrando o potencial antiartrítico, já utilizado popularmente, desta planta (MANAHEJI *et al.*, 2011).

Estudos utilizando testes de contorções abdominais, placa-quente, formalina e edema de pata induzido por carragenina, mostraram que o extrato aquoso das folhas possui atividade antinociceptiva centralmente mediada pela via opióide e periféricamente não-opióide, além de atividade anti-inflamatória, sendo estes efeitos exercidos de maneira dose-dependente (SULAIMAN *et al.*, 2008).

Foi reportado também que infusões em água quente das sementes de moringa, quando administradas oralmente, resultavam em significativa inibição de edema de pata induzido por carragenina, demonstrando assim atividade anti-inflamatória (CÁCERES *et al.*, 1992). Extratos etanólico e etil-acetato das sementes mostraram significativa atividade antipirética em ratos, quando comparado ao controle paracetamol, fármaco conhecido por inibir a produção de mediadores inflamatórios que causam a febre (HUKKERI *et al.*, 2006), além de reduzir os níveis de mediadores inflamatórios no sangue e infiltração de leucócitos para a articulação líquido-sinovial em modelo de artrite experimental (MAHAJAN; MALI; MEHTA, 2007a). O mesmo extrato etanólico das sementes foi investigado quanto ao seu efeito sobre anafilaxia sistêmica e cutânea, no qual resultou em inibição da liberação de histamina por mastócitos (MAHAJAN; MALI; MEHTA, 2007b). Além disso, Mahajan e Mehta (2010) demonstraram que o extrato etanólico das sementes possui atividade

imunossupressora, suprimindo tanto a resposta humoral como a celular e também diminuindo a atividade fagocítica de macrófagos. Recentemente foi estudada a atividade anti-inflamatória *in vitro* de extrato dos frutos cozidos (incluindo sementes) de *M. oleifera* medindo-se a expressão de mediadores pró-inflamatórios induzida por lipopolissacarídeo em linhagem RAW 264.7 de macrófagos de murinos. Mediadores como óxido nítrico, TNF- $\alpha$  e IL-6 foram diminuídos assim como a expressão de enzimas ligadas ao processo inflamatório, como iNOS e COX-2. Proteínas responsáveis pela transdução do sinal e pela indução da transcrição de genes relacionados à inflamação também tiveram suas expressões diminuídas (MUANGNOI *et al.*, 2011). Estudos *in vivo* revelaram que o extrato hidro-alcoólico dos frutos possui significativa atividade antinociceptiva central e periférica justificando o tradicional uso desses frutos em diversas enfermidades relacionadas a dor e inflamação (SHARMA *et al.*, 2012).

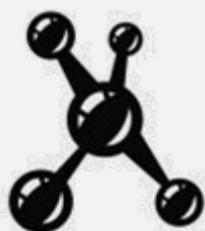
Apesar das sementes de moringa serem constituídas em grande parte (40%) de proteínas, não há muitos relatos na literatura de princípios de natureza proteica com atividades analgésica e anti-inflamatória. As proteínas que já foram isoladas de sementes de Moringa geralmente estão relacionadas à sua propriedade floculante (LUZ *et al.*, 2013).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa, isolou uma lectina ligante à quitina a partir de sementes de *M. oleifera* denominada de *Mo-CBP<sub>4</sub>* com potente atividade analgésica e anti-inflamatória, sendo considerada uma molécula bastante promissora para uso terapêutico. *Mo-CBP<sub>4</sub>* é uma glicoproteína de massa molecular aparente de 9,8 kDa em condições redutoras, atividade floculante e ponto isoelétrico de 10,55. Em contraste às outras lectinas encontradas em sementes de *M. oleifera*, *Mo-CBP<sub>4</sub>*, apesar de ser uma proteína que se liga ao polissacarídeo quitina, não foi capaz de aglutinar eritrócitos de coelhos ou humanos (A, B e O), mesmo quando tratados com tripsina. Segundo a classificação de lectinas proposta por Peumans e van Damme (1995), *Mo-CBP<sub>4</sub>* estaria inserida no grupo das merolectinas, proteínas incapazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados, devido à presença de um único sítio de ligação a carboidrato.

*Mo-CBP<sub>4</sub>* foi capaz de inibir significativamente o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos de maneira dose dependente com atividade máxima na dose de 10 mg/kg, cuja inibição observada foi

de 98,9% e 52,9% quando administrada pela via intraperitoneal e oral, respectivamente. *Mo-CBP<sub>4</sub>* também apresentou considerável atividade anti-inflamatória já que foi capaz de inibir o aumento da permeabilidade vascular em 89,1% também na dose de 10 mg/kg, utilizando o ácido acético como agente flogístico (PEREIRA *et al.*, 2011). Os dados mostrados anteriormente fazem parte do primeiro trabalho experimental envolvendo atividades farmacológicas de proteínas ligantes à quitina de sementes de moringa e mostram que, pelo menos boa parte das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva atribuídas para as sementes são promovidas por um fator de natureza protéica. Em comparação com os controles experimentais utilizando anti-inflamatório não-esteroidais clássicos como a indometacina, *Mo-CBP<sub>4</sub>* apresentou potência farmacológica similar quando utilizada na mesma dose. Além disso, em ensaios preliminares não foi possível observar a presença de lesões gástricas em animais que receberam a administração da proteína, embora esses sejam efeitos colaterais típicos de inibidores de ciclooxigenases tradicionalmente utilizados como anti-inflamatórios. Contudo, apesar do seu grande potencial biotecnológico para aplicação terapêutica, diversos aspectos relacionados à caracterização estrutural, definição do mecanismo geral de ação e espectro de atividades, bem como da avaliação da sua segurança farmacológica precisam ainda ser esclarecidos. Portanto, para o presente trabalho foi proposta a seguinte hipótese:

***“Mo-CBP<sub>4</sub>, uma proteína ligante à quitina presente em sementes de Moringa oleifera, possui ação anti-inflamatória e antinociceptiva podendo ser usada por via oral. Assim como outras lectinas, suas propriedades farmacológicas são dependentes do seu sítio de interação à carboidrato. Desde que sementes de M. oleifera possuem baixa toxicidade, Mo-CBP<sub>4</sub> apresenta-se segura quanto ao uso.”***



## Capítulo 2

Caracterização Estrutural da *Mo*-CBP<sub>4</sub>

## 1. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA

---

A utilização de plantas para o tratamento de diversas enfermidades humanas é uma prática muito antiga e constitui a base do sofisticado sistema da medicina tradicional (GURIB-FAKIM, 2006). Embora nos últimos anos essa prática milenar tenha perdido espaço para medicamentos sintéticos, o uso prolongado destas drogas, seus efeitos colaterais associados, bem como a incerteza quanto à sua segurança abriu um caminho para uma era de sistema alternativo de medicina, ou seja, a medicina herbal (RAMOS *et al.*, 2005; JAIN; JOHNSON; KRISHNAN, 2012).

Durante as últimas décadas, devido aos avanços em biotecnologia, uma maior ênfase tem sido dada aos efeitos farmacológicos de peptídeos e proteínas (GAIDAMASHVILI e VAN STADEN, 2006). O estabelecimento da tecnologia do DNA recombinante possibilitou o desenvolvimento de uma grande variedade de proteínas terapêuticas para o tratamento de diversas doenças. Atualmente, mais de 130 proteínas ou peptídeos diferentes foram aprovados para o uso clínico pela *US Food and Drug Administration* (FDA) e muitos outros estão em desenvolvimento (LEADER; BACA; GOLAN, 2008). Espera-se que para 2015, o número de medicamentos originados da biotecnologia alcancem cerca de 50 % de todas as novas entidades químicas aprovadas e que em 2025 aumente para mais de 70% (STROHL; KNIGHT, 2009). Dentre as vantagens na utilização de proteínas para fins terapêuticos, destaca-se a alta especificidade a um conjunto de funções complexas que moléculas de pequeno tamanho são incapazes de mimetizar, interferindo pouco nos processos biológicos normais, acarretando uma menor quantidade de efeitos adversos (LEADER; BACA; GOLAN, 2008; STROHL e KNIGHT, 2009).

Apesar da grande diversidade de plantas medicinais existentes, poucas proteínas derivadas de vegetais são exploradas com o objetivo terapêutico, o que consiste em um fato bastante contraditório. Apenas algumas proteínas, a exemplo da papaína e algumas lectinas com propriedades farmacológicas, encontram-se em uso clínico ou em triagem clínica (LEADER; BACA; GOLAN, 2008; LIU *et al.*, 2010). Portanto, a prospecção de proteínas vegetais com potencial terapêutico torna-se um campo promissor para estudos futuros.

Seguindo essa tendência, *Moringa oleifera*, uma espécie originária do Nordeste da Índia, se destaca pelo seu valor medicinal, uma vez que extratos de todas

as partes desta planta mostraram propriedades farmacológicas reconhecidas pelo uso popular e corroboradas pela comunidade científica (FERREIRA *et al.*, 2008). Quase todas as partes da planta podem ser consumidas e são de grande valor nutricional. Além disso, suas sementes são vastamente usadas para purificação de água em lugares que a água potável se encontra escassa (NDABIGENGESERE e NARASIAH, 1996; MAKKAR e BECKER, 1997).

Atividades hipotensiva, anticancerígena, anti-inflamatória, analgésica, antibiótica, antitripanossomal, anti-ulcerativa, hipocolesterolêmica, hipoglicemiante e hepatoprotetora são propriedades que tem sido reportadas pelo uso popular e estudadas pela comunidade científica (FAIZI *et al.*, 1995; EZEAMUZLE *et al.*, 1996; MURAKAMI *et al.*, 1998; CHUANG *et al.*, 2007; CHUMARK *et al.*, 2008; FAKURAZI *et al.*, 2008; JAISWAL *et al.*, 2009). Em particular, propriedades anti-inflamatória e antinociceptiva foram reportadas para raízes, folhas e sementes (CÁRCERES *et al.*, 1992; SASHIDHARA *et al.*, 2009; SULAIMAN *et al.*, 2008).

Dados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que *Mo*-CBP<sub>4</sub>, na dose de 10 mg/kg inibiu em 98,9%, via intraperitoneal e 52,9%, via oral o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos, um modelo experimental de dor inflamatória tradicionalmente utilizado como ferramenta de triagem para descoberta de novos agentes analgésicos. Os resultados obtidos permitem concluir que a potência observada, tanto para o efeito analgésico como para a atividade anti-inflamatória detectada para as sementes de *M. oleifera* é devido, pelo menos em parte, à presença de um princípio de natureza proteica. Portanto, um estudo mais apurado acerca da estrutura desta proteína é necessário para propor um potencial uso terapêutico desta proteína, fornecendo dados que ajudem na elucidação do seu mecanismo de ação, segurança de utilização e estabilidade da nova droga.

Assim, as atividades propostas neste capítulo tem como eixo o seguinte questionamento:

*Tendo sido definido que as atividades farmacológicas detectadas para as sementes de M. oleifera são causadas, pelo menos em parte, por um princípio de natureza protéica, quais características estruturais são inerentes a essa molécula?*

## **2. OBJETIVOS**

---

### **2.1. Gerais**

Purificar e caracterizar estruturalmente *Mo-CBP<sub>4</sub>*, uma proteína de sementes de *Moringa oleífera*, como etapa preliminar da análise de seu potencial terapêutico.

## 2.2. Específicos

- Purificar *Mo-CBP<sub>4</sub>*, a partir de sementes de *M. oleífera*, através de técnicas cromatográficas;
- Determinar pureza e massa molecular através de espectrometria de massa, bem como obter fragmentos da estrutura primária da proteína;
- Isolar as cadeias de *Mo-CBP<sub>4</sub>* e determinar as respectivas sequências NH<sub>2</sub>-terminal por degradação de Edman;
- Estudar a estrutura secundária de *Mo-CBP<sub>4</sub>* através de técnicas espectroscópicas como dicroísmo circular e fluorescência;
- Avaliar a estabilidade de *Mo-CBP<sub>4</sub>* frente às variações de temperatura e pH, verificando mudanças na estrutura secundária da mesma.

### 3. MATERIAIS

---

#### 3.1. Sementes

Sementes de *Moringa oleifera* Lamarck foram coletadas de árvores situadas no Campus do Pici, da Universidade Federal do Ceará (UFC), nos meses de Janeiro a Abril dos anos de 2010, 2011 e 2012. A exsicata da espécie está depositada no Herbário Prisco Bezerra sob o número EAC34591, na UFC.

#### 3.2 Reagentes químicos e outros materiais

Acrilamida, *N,N'*-metileno bisacrilamida, albumina sérica bovina, "Coomassie Brilliant Blue" G e R, ditiotreitól, iodoacetamida, marcadores de massa molecular, *N*-acetil-*D*-glucosamina, persulfato de amônio, quimotripsina, quitina, TEMED, Tris e tripsina foram obtidos da Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA.

Tripsina modificada com grau de pureza para sequenciamento foi obtida da Promega, Wisconsin, EUA.

Acetonitrila grau HPLC e ácido fórmico foram obtidos da Tedia®, Rio de Janeiro, Brasil.

$\beta$ -mercaptoetanol e dodecil sulfato de sódio (SDS) foram obtidos da Merck, Darmstadt, Alemanha.

As matrizes cromatográficas CM-Sepharose™ *Fast Flow* e Sephadex® G-25 foram adquiridas da GE Healthcare, Suécia.

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

## 4. MÉTODOS

---

### 4.1. Purificação da *Mo-CBP<sub>4</sub>*

*Mo-CBP<sub>4</sub>* foi purificada seguindo a metodologia descrita por Pereira e colaboradores (2011) com algumas modificações. Brevemente, farinha de sementes de *Moringa oleifera*, previamente delipidada com éter de petróleo (1:10 m/v), foi posta em contato com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M, na proporção 1:10 (m/v) e deixada sob agitação moderada por 4 horas a 4 °C. Em seguida, a suspensão foi filtrada em pano de trama fina e centrifugada a 15.000 x g, 30 minutos a 4 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante obtido foi filtrado em papel de filtro e denominado extrato total. Este extrato foi então submetido à diálise exaustiva contra água destilada, em membrana de porosidade de 12 kDa, 4 °C, sob agitação moderada. A suspensão obtida foi centrifugada a 15.000 x g, por 30 minutos, a 4 °C. O material proteico presente no sobrenadante, chamado de fração albumínica, foi separado do precipitado (fração globulínica). A fração albumínica foi liofilizada e ressuspendida em tampão de equilíbrio para a cromatografia de afinidade em matriz de quitina.

O primeiro passo cromatográfico foi realizado em matriz de quitina (192,3 mL; 3,5 x 20,0 cm) equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo NaCl 0,15 M. Setecentas miligramas de fração albumínica foram solubilizadas em 15 mL de tampão de equilíbrio e centrifugada a 8.000 x g, por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi aplicado na matriz, deixando em repouso por 1 hora. O material não retido foi eluído com o tampão de equilíbrio, em um fluxo de 30 mL/h, sendo coletadas frações de 5 mL. As proteínas ligantes à quitina foram eluídas com ácido acético 0,05 M, em fluxo de 60 mL/h, coletando-se frações de 5 mL. As frações eluídas foram monitoradas por leitura de absorbância a 280 nm. O pico proveniente da eluição com ácido acético (P<sub>AC</sub>) foi reunido e dialisado contra água destilada, liofilizado e acondicionado em frascos hermeticamente fechados, a 4 °C.

Para o segundo passo cromatográfico foi utilizado matriz de CM-Sepharose™ *Fast Flow* (GE Helthcare), previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2. Cem miligramas de P<sub>AC</sub> foi ressuspendido em 2 mL de tampão de equilíbrio e centrifugado a 8.000 x g, por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante

foi aplicado a coluna e as proteínas foram eluídas em fluxo contínuo de 30 mL/h, em frações de 3 mL. A cromatografia foi monitorada através de leituras de absorvância a 280 nm. Todas as proteínas eluídas receberam a denominação de *Mo-CBP* (*Mo*: *Moringa oleifera* e *CBP*: *chitin-binding protein*), acrescidas de um número na ordem em que foram eluídas. As proteínas não retidas foram eluídas utilizando o tampão de equilíbrio, onde o pico resultante foi chamado de *Mo-CBP*<sub>4</sub>. As proteínas retidas foram eluídas com o tampão de equilíbrio acrescido de concentrações crescentes de NaCl. *Mo-CBP*<sub>4</sub> foi o pico eluído com tampão de equilíbrio acrescido de NaCl 0,6 M (FIGURA 1).

#### **4.1.1. Determinação do teor de proteínas**

A determinação de proteínas totais foi realizada seguindo a metodologia descrita por Bradford (1976). A 100 µL de amostra, em diversas concentrações, foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. A mistura foi agitada e, após 10 minutos, foram feitas as leituras das absorvâncias em espectrofotômetro (tipo Novapesc II, Pharmacia) a 595 nm. A concentração proteica foi estimada através de uma curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas de albumina sérica bovina (BSA).

#### **4.1.2. Eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida**

Com o objetivo de verificar a pureza de *Mo-CBP*<sub>4</sub>, bem como determinar sua massa molecular aparente, foi realizada eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida, seguindo a metodologia descrita por Laemmli (1970), adaptada para o uso em placas medindo 10,0 x 8,0 cm. O gel de aplicação encerrava 3,5% de acrilamida e 1,0% de SDS, preparados em tampão Tris-HCl 1,0 M, pH 6,8, e o gel de separação, 17,5% de acrilamida e 1,0% de SDS, em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8. A proteína foi dissolvida em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, contendo 1,0% de SDS, na presença ou não de β-mercaptoetanol, 1,0% e, em seguida, aquecida a 100 °C, por 10 minutos, e centrifugada a 10.000 x g, por 5 minutos (10 °C). Ao sobrenadante, foram adicionados cristais de glicina, além de azul de bromofenol 0,1%, para conferir densidade e cor, respectivamente. A corrida eletroforética foi realizada em sistema vertical (MV10COMP, Biosystems), onde o gel foi submetido a uma voltagem de 200

V e amperagem 35 mA. Como marcadores de massa molecular foram utilizados: fosforilase B (97,0 kDa), albumina sérica bovina (67,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica bovina (29,0 kDa), inibidor de tripsina da soja do tipo Kunitz (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactalbumina (14,2 kDa). Como marcadores de baixa massa molecular foram utilizados produtos da clivagem de globina de coração de cavalo: globina (16,9 kDa), globina I+II (14,4 kDa), globina I+III (10,7), globina I (8,1 kDa), globina II (6,2 kDa) e globina III (2,5 kDa). As bandas protéicas foram visualizadas através da coloração por *Coomassie Brilliant Blue R-250* 0,25% dissolvido em uma solução de metanol, ácido acético e água (1,0:3,5:8,0 v/v/v), por um período de 2 horas. Em seguida, foi procedido o descoloramento do gel com solução de metanol, ácido acético e água (1,0:3,5:8,0 v/v/v). Comparação das mobilidades das bandas protéicas em relação àquelas dos marcadores foi empregada para o cálculo da massa molecular aparente de *Mo-CBP<sub>4</sub>*.

## 4.2. Espectrometria de massa

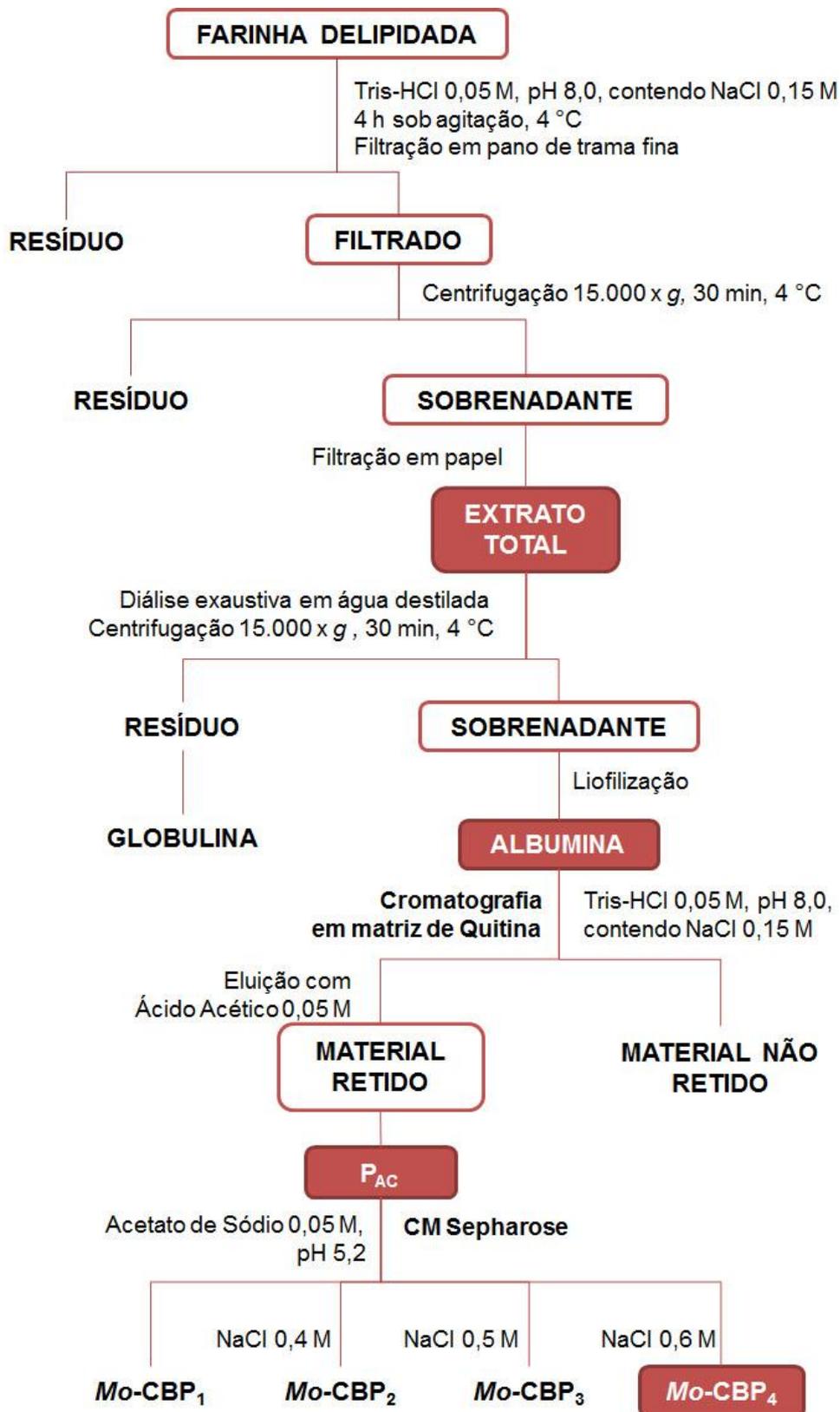
### 4.2.1. Determinação da massa molecular da *Mo-CBP<sub>4</sub>*

Com o objetivo de verificar a pureza de *Mo-CBP<sub>4</sub>*, bem como determinar sua massa molecular, foi realizada uma análise do tipo ESI-TOF em espectrômetro de massa Synapt HDMS (Waters, Manchester, UK) acoplado a um sistema de UPLC NanoACQUITY. *Mo-CBP<sub>4</sub>* foi analisada tanto em sua forma íntegra como reduzida. Para redução, 50  $\mu$ L de uma solução de 1 mg/mL da proteína em ácido fórmico 1% foi aquecida por 15 minutos a 80 °C. Após isso, foi adicionado 2,5  $\mu$ L de ditioneitol 0,1 M e aquecido a 60 °C, por 20 minutos, para completa redução das cadeias. A alquilação dos grupamentos sulfidrilas expostos foi realizada adicionando-se 2,5  $\mu$ L de iodoacetamida 0,3 M, protegendo da luz.

Dez microlitros da amostra (reduzida ou não) foi primeiramente submetida a uma cromatografia de fase reversa em coluna C18 BEH (1,7 mm  $\times$  100 mm  $\times$  10 cm) acoplada ao UPLC, usando um gradiente de 5 a 80% (v/v) de acetonitrila em ácido fórmico 0,1% (v/v) em um fluxo contínuo de 600 nL/minuto. Os espectros de *Mo-CBP<sub>4</sub>* foram processados usando uma técnica de entropia máxima (MaxEnt).



**Figura 1 - Esquema geral de purificação da *Mo*-CBP<sub>4</sub> a partir de farinha delipidada de sementes de *M. oleifera***



Fonte: elaborada pela autora.

#### 4.2.2. Sequência de peptídeos trípticos de *Mo-CBP<sub>4</sub>*

Espectrometria de massa ESI-Q-TOF MS/MS foi utilizada para a obtenção de sequência de peptídeos trípticos de *Mo-CBP<sub>4</sub>*. Para isso, a proteína previamente reduzida (como descrito anteriormente), foi submetida à digestão utilizando tripsina modificada (Promega), na proporção 1:100 (enzima:proteína), *overnight*. Alíquota de 5 µL da solução de *Mo-CBP<sub>4</sub>* digerida foi aplicada. O espectrômetro foi programado para automaticamente trocar entre MS de energia baixa (3 eV) e de energia de colisão elevada MSE (12-55 eV), aplicada à armadilha CID 'onda T' (dissociação induzida por colisão celular), com gás argônio. A transferência a partir da célula de colisão foi ajustada para 1 eV, com tempo de varredura de 1,5 s, tanto em baixa quanto em alta energia. Após o analisador de aceleração do tempo-de-voo (TOF-oA), foram colhidos espectros de relação m/z 50-3000. O deslocamento RF (MS perfil) do quadrupolo foi ajustado para que os dados de CL/MS fossem efetivamente adquiridos de relação m/z de 300 a 2500, assegurando que qualquer massa menor que m/z 300 observada nos dados de CL/MSE surgisse a partir de dissociações na célula de colisão. Desse modo, os valores de baixa massa eram sabidamente produtos de fragmentação CID, e não de fragmentação na fonte. Na deconvolução do espectro foi utilizado o princípio de otimização de entropia máxima (MaxEnt). Os espectros gerados foram analisados usando o programa Mass Lynx™ (Waters), onde os dados obtidos de MS e MS/MS foram processados e submetidos, juntamente ao programa de buscas Protein Lynx Global Server. Foi realizada uma análise comparativa das sequências dos peptídeos obtidos com proteínas depositadas no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) usando a ferramenta de busca BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### 4.3. Determinação da sequência NH<sub>2</sub>-terminal

Para determinação da sequência NH<sub>2</sub>-terminal de *Mo-CBP<sub>4</sub>*, fez-se inicialmente o isolamento de suas subunidades. A proteína (10 mg/mL) reduzida e alquilada foi dessalinizada utilizando uma coluna Sephadex® G-25 (GE Healthcare). A amostra foi então submetida a uma cromatografia de fase reversa em coluna C18 (4,6 x 100 mm) acoplada ao sistema de HPLC (Waters) utilizando um gradiente linear

(5-90%) de acetonitrila (ACN), por 50 minutos, a um fluxo de 0,2 mL/minuto. Para tanto, foram utilizados o solvente A (5% ACN, 95% H<sub>2</sub>O contendo 0,05% TFA) e o solvente B (90% ACN). A cromatografia foi monitorada pela absorbância no comprimento de onda de 230 nm. O material eluído foi dialisado e liofilizado para análise em eletroforese seguindo a metodologia anteriormente descrita em gel de poliacrilamida 17,5%.

Para obtenção da sequência de aminoácidos NH<sub>2</sub>-terminal das cadeias de *Mo*-CBP<sub>4</sub>, foi utilizado um sequenciador automático de proteínas (Shimadzu PPSQ-23A), baseado no princípio de degradação de Edman. Os derivados feniltioidantoína dos aminoácidos (PTH-aminoácidos) foram detectados a 269 nm, após separação em coluna de fase reversa C18 (4,6 x 2,5 mm), conduzida sob condições isocráticas de acordo com as instruções do fabricante. A sequência de aminoácidos obtida foi submetida à análise comparativa através do sistema NCBI-BLAST. As proteínas que demonstraram melhor percentual de identidade foram selecionadas e alinhadas com o auxílio do programa Clustal Ômega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e analisadas.

#### **4.4. Caracterização espectroscópica**

##### **4.4.1. Espectro de absorção eletrônica**

O espectro de absorção de *Mo*-CBP<sub>4</sub> foi determinado em espectrofotômetro Spectronic 7 (Pharmacia-LKB), utilizando cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico. A proteína (1 mg/mL) foi dissolvida em água grau Milli-Q e a absorção verificada na região de 220 a 350 nm. O aparelho foi zerado com água nos comprimentos de onda analisados. O coeficiente de extinção para o comprimento de onda de 280 nm foi calculado através da fórmula abaixo (Lei de Lambert-Beer), onde  $\epsilon$  corresponde ao coeficiente de extinção;  $A_{280}$ , a absorbância no comprimento de onda de 280 nm;  $c$ , a concentração da amostra e  $L$ , o caminho óptico percorrido (cm).

$$\epsilon = A_{280}/c \times L$$

##### **4.4.2. Espectro de dicroísmo circular**

Para a obtenção do espectro de dicroísmo circular de *Mo*-CBP<sub>4</sub> foi utilizado o espectropolarímetro JASCO J-715, em atmosfera de nitrogênio, a 25 °C, utilizando o comprimento de onda de 190-250 nm. *Mo*-CBP<sub>4</sub> (0,4 mg/mL) solubilizada em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0 foi colocada em cubeta de quartzo retangular com 0,1 cm de passo óptico. Todas as medidas foram realizadas com 8 scans sucessivos, com velocidade de varredura de 20 nm/minuto e tempo de resposta de 4 segundos, cuja média foi utilizada para análise. No intuito de quantificar os elementos de estrutura secundária foram utilizados três diferentes métodos (CDSSTR, CONTINLL e SELCON3) disponíveis no programa CDPro (SREERAMA; WOODY, 2000).

Utilizando a mesma metodologia, analisou-se a estabilidade de *Mo*-CBP<sub>4</sub> frente à variação de temperatura. A proteína (0,4 mg/mL) foi dissolvida em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0, e incubada em temperatura variando de 20 °C a 90 °C, com intervalos de 5 °C, durante 10 minutos em cada temperatura, seguida da determinação do espectro de dicroísmo circular.

A estabilidade de *Mo*-CBP<sub>4</sub> também foi avaliada frente a diferentes valores de pH. Dessa forma, a proteína (0,4 mg/mL) foi dissolvida e incubada por 30 minutos em tampão glicina/HCl 0,05 M pH 2,0 e 3,0, acetato de sódio 0,05 M pH 5,0, fosfato de sódio 0,05 M pH 7,0, glicina/NaOH 0,05 M, pH 9,0 e fosfato de sódio 0,05 M, pH 11,0 antes da obtenção do espectro de dicroísmo circular.

#### **4.4.3. Espectro de fluorescência**

Para a obtenção dos espectros de fluorescência de *Mo*-CBP<sub>4</sub>, foi utilizado um espectrofluorímetro modelo ISS K2(IL, USA), em cubeta retangular de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Amostras da proteína (0,02 mg/mL em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0) foram excitadas a 280 nm e 295 nm e o espectro de emissão foi coletado no intervalo de 300 a 440 nm.

## 5. RESULTADOS

---

### 5.1. Purificação da *Mo*-CBP<sub>4</sub>

O extrato total obtido apresentou uma quantidade de proteínas correspondente a  $206,41 \pm 3,55$  mg/gF (TABELA 1). Do extrato total, através de diálise exaustiva contra água e centrifugação, foi obtida a fração albumínica, que devido ao grande volume, foi submetida a congelamento seguido de liofilização, correspondendo à primeira modificação na purificação descrita por Pereira e colaboradores (2011). O rendimento proteico referente a esta fração foi de  $113,45 \pm 3,61$  mg/gF, representando 54,96% das proteínas do extrato total.

Com a finalidade de obter proteínas ligantes à quitina a partir da fração albumínica, foi realizada uma cromatografia de afinidade em coluna de quitina. A Figura 2 mostra o perfil cromatográfico após eluição com ácido acético 0,05 M para obtenção da fração P<sub>AC</sub>. Não foi utilizado o açúcar *N*-acetil-D-glucosamina para eluição de material ligante a quitina, como descrito no protocolo anterior, correspondendo então à segunda modificação. O rendimento proteico desta fração após diálise e liofilização foi de  $47,57 \pm 5,46$  mg/gF. P<sub>AC</sub> foi utilizado para o próximo passo cromatográfico.

A partir da cromatografia em matriz de troca iônica CM-Sepharose, P<sub>AC</sub> foi separado em quatro frações distintas, que foram chamados de *Mo*-CBP (*Mo*: *Moringa oleifera*; CBP: *chitin-binding protein*), com números subscritos de 1 a 4 de acordo com a ordem de eluição (FIGURA 3). A troca da matriz (de Resource S para CM-Sepharose) e a não utilização do cromatógrafo FPLC corresponderam à terceira modificação realizada neste protocolo. Após liofilização, *Mo*-CBP<sub>4</sub> mostrou-se com um rendimento de aproximadamente 13 mg para cada grama de farinha, correspondendo a 6,33% das proteínas do extrato total (TABELA 1).

O perfil eletroforético de *Mo*-CBP<sub>4</sub> sob condições desnaturantes em gel de poliacrilamida 17,5% (FIGURA 4) mostra que, na ausência de agente redutor (P<sub>i</sub>), *Mo*-CBP<sub>4</sub> apresentou-se como duas bandas proteicas (28,0 kDa e 17,0 kDa). Em condições redutoras a proteína apresenta duas cadeias de massas moleculares diferentes (7,0 kDa e 5,0 kDa).

**Tabela 1 - Etapas de purificação da *Mo*-CBP<sub>4</sub>, com os respectivos teores e rendimentos proteicos**

<b>Etapas de purificação</b>	<b>Proteína (mgP/gF)<sup>a</sup></b>	<b>Rendimento (%)<sup>b</sup></b>
Extrato Total	206,41 ± 3,55	100,0
Fração Albumínica	113,45 ± 3,61	54,96
P <sub>AC</sub> <sup>c</sup>	47,57 ± 5,46	23,05
<i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub> <sup>d</sup>	13,06 ± 1,56	6,33

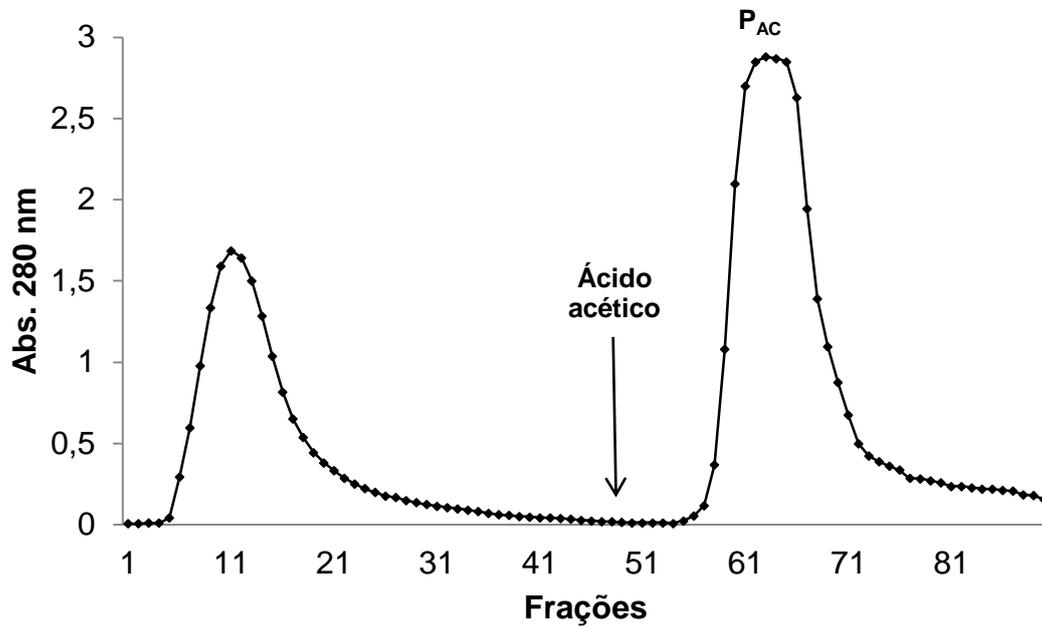
Os resultados representam a média ± desvio padrão de três experimentos similares.

<sup>a</sup> Quantidade total de proteína recuperada (mg) em cada etapa de purificação por grama de farinha de sementes de *M. oleifera*.

<sup>b</sup> Recuperação de proteína em cada etapa de purificação, considerando aquela determinada no extrato total como sendo 100%.

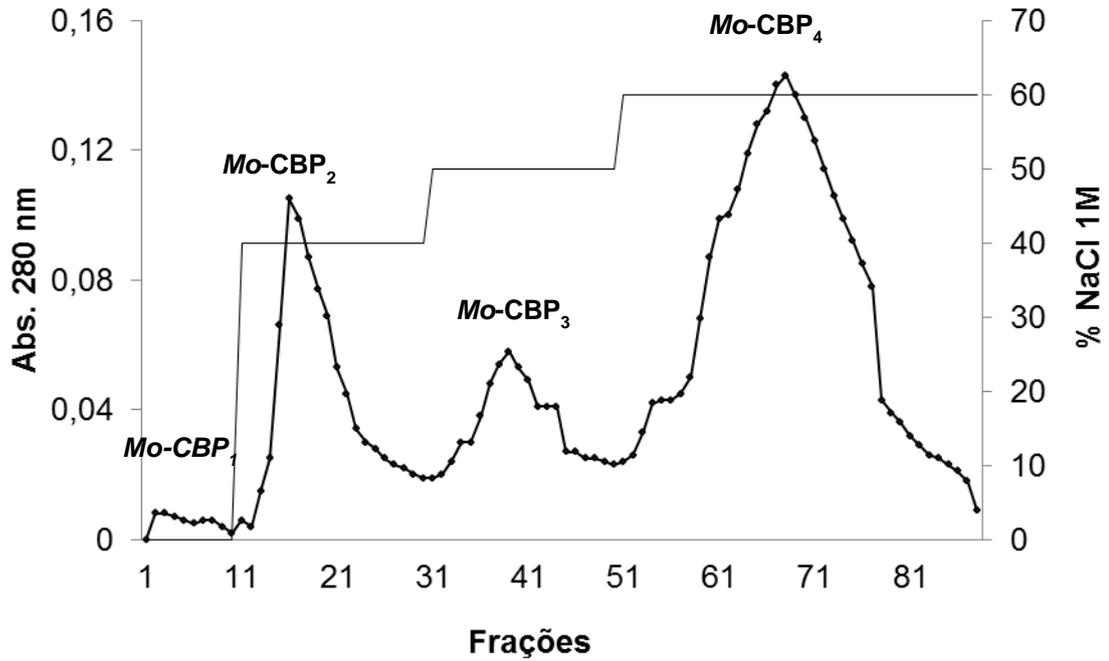
<sup>c</sup> Fração proteica ligante à quitina eluída com ácido acético.

<sup>d</sup> *Mo*-CBP<sub>4</sub> retida na CM-Sepharose, eluída com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, contendo NaCl 0,6 M.

**Figura 2 - Cromatografia de afinidade em matriz de quitina**

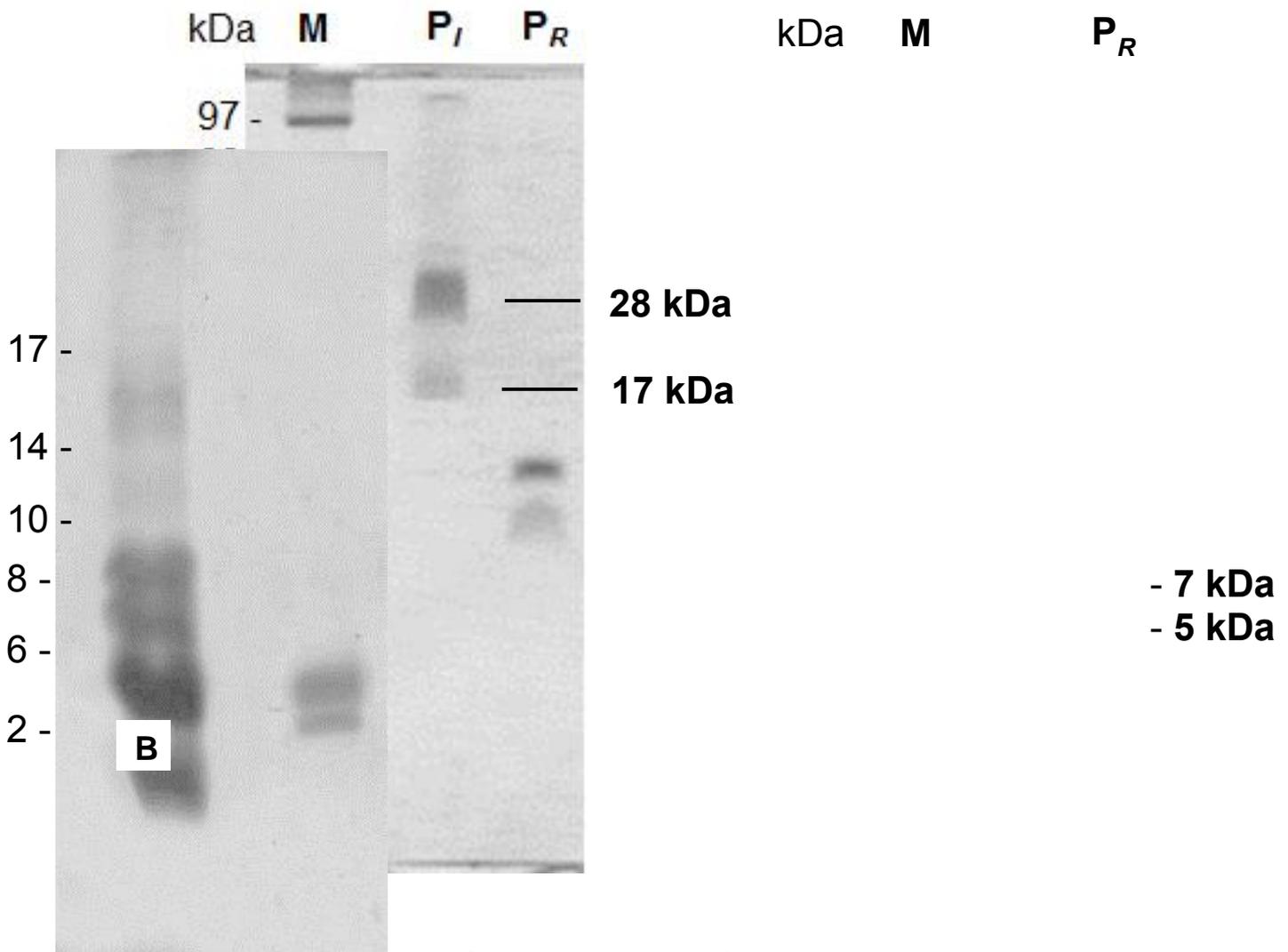
A fração albumínica das sementes (700 mg de proteína) foi aplicada em matriz de quitina (192,3 mL; 3,5 x 20,0 cm), previamente equilibrada com Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, contendo 0,15 M de NaCl. P<sub>1</sub>: proteínas não retidas eluídas com o tampão de equilíbrio. P<sub>AC</sub>: proteínas retidas eluídas com ácido acético 0,05 M. Frações : 5 mL; fluxo: 60 mL/h.

**Figura 3 - Cromatografia de troca iônica em matriz de CM-Sepharose**



$P_{AC}$  (100 mg) foi aplicado em CM-Sepharose (53 mL; 1,5 x 7,5 cm) previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2.  $Mo-CBP_4$  corresponde a proteína eluída com o tampão de equilíbrio acrescido de 60% de NaCl 1 M.  $Mo-CBP$  representam as proteínas ligantes a quitina purificadas das sementes de *M. oleifera*. Frações: 3 mL; fluxo: 30 mL/h.

Figura 4 - Perfil eletroforético da *Mo*-CBP<sub>4</sub> em condições desnaturantes



Amostras de *Mo*-CBP<sub>4</sub> (5 µg de proteína reduzida ou não), foram aplicadas em gel de poliacrilamida 17,5%. (A) perfil eletroforético de *Mo*-CBP<sub>4</sub> em condições não redutoras e redutoras e em (B) apenas em condições redutoras e marcador de baixa massa molecular. Raia M - marcadores de massa molecular; Raias P<sub>I</sub> e P<sub>R</sub> – *Mo*-CBP<sub>4</sub> em condições não redutora e redutora, respectivamente. O gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue R-250*.

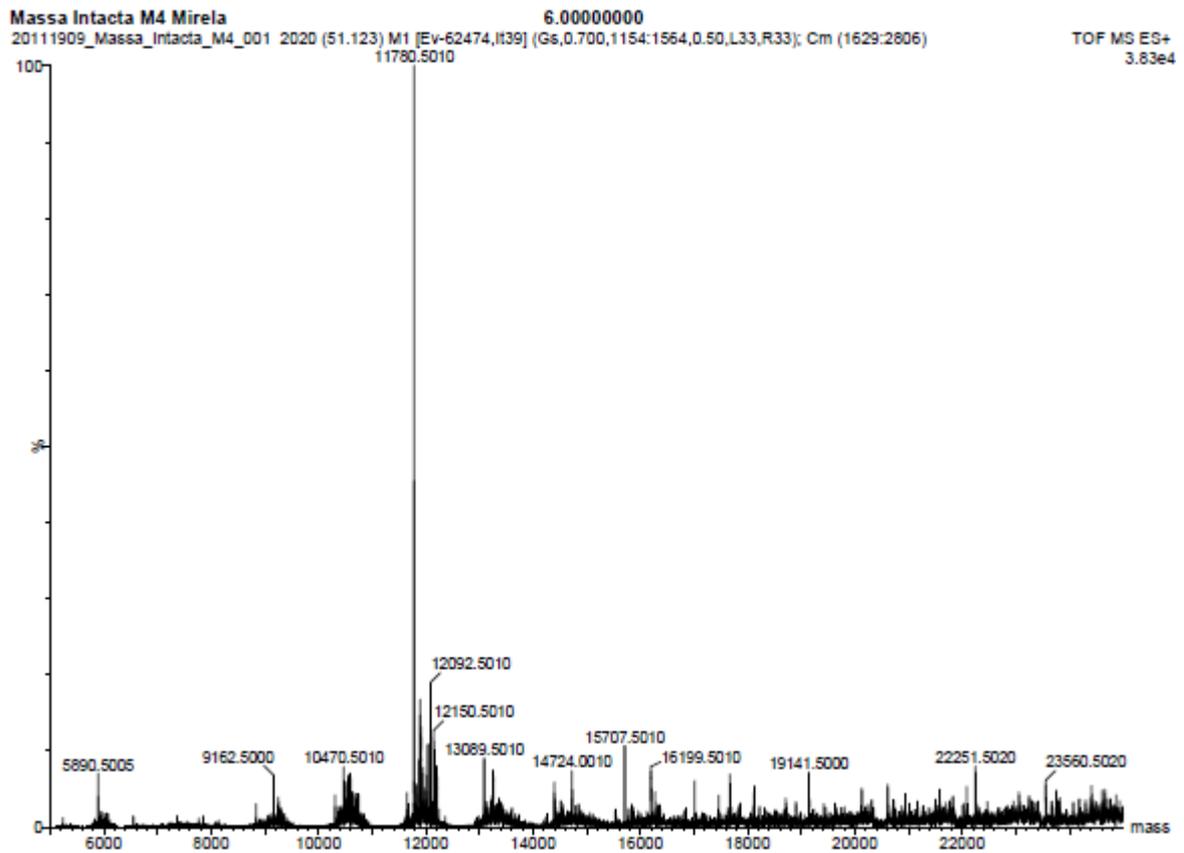
## 5.2. Espectrometria de massa

### 5.2.1. Determinação da massa molecular de *Mo-CBP<sub>4</sub>*

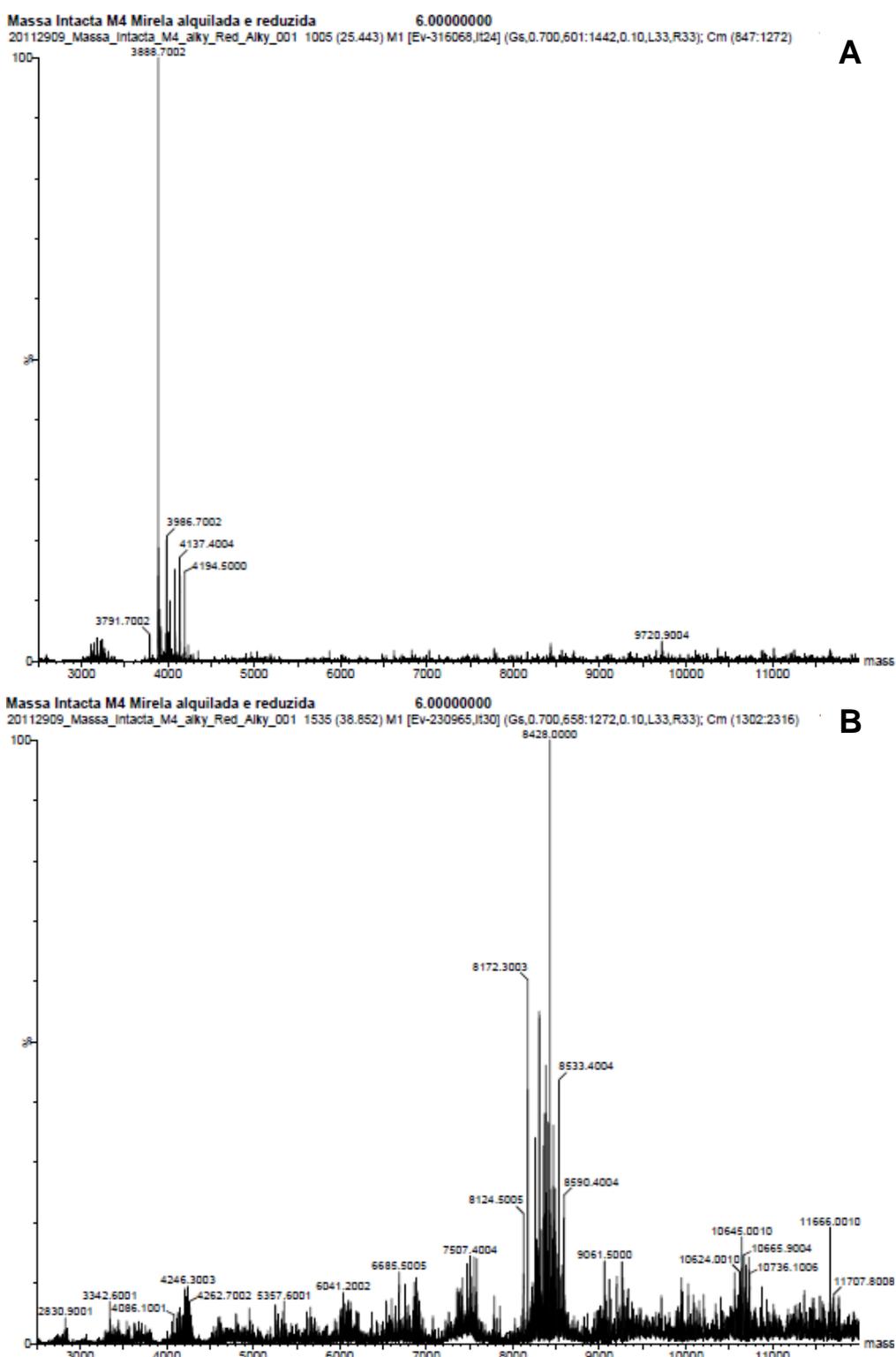
Com a finalidade de se obter as massas moleculares da proteína íntegra, bem como de suas subunidades, *Mo-CBP<sub>4</sub>* foi submetida à análise em espectrômetro de massa do tipo ESI-TOF. O espectro de massa desconvoluído da proteína íntegra (FIGURA 5) mostra um pico majoritário com massa molecular de 11,780 kDa, apesar do perfil eletroforético em condições desnaturantes mostrar duas bandas proteicas (27 kDa e 16 kDa). *Mo-CBP<sub>4</sub>* reduzida e alquilada apresentou espectro de massa com dois picos principais: um menor com massa molecular de 3,888 kDa e um maior com 8,428 kDa (FIGURAS 6A e 6B, respectivamente), mostrando que a proteína possui duas cadeias de massas moleculares distintas ligadas por pontes dissulfeto.

### 5.2.2. Sequência de peptídeos trípticos de *Mo-CBP<sub>4</sub>*

*Mo-CBP<sub>4</sub>* também foi submetida à digestão tríptica, seguida de análise em espectrômetro de massa do tipo ESI-Q-TOF MS/MS em uma tentativa de se obter sequência dos peptídeos gerados. Após busca em banco de dados e alinhamento com proteínas com sequências depositadas, foram identificados 4 peptídeos representativos apresentando alta similaridade com outras proteínas de sementes de *M. oleifera*, além de albuminas 2S de outras espécies de planta como, *Sesamum indicum*, *Corylus avellana* e *Capparis masaikai* (TABELAS 2 e 3)..

**Figura 05 - Espectro de massa de *Mo*-CBP<sub>4</sub> íntegra por TOF-ESI-MS**

Espectro desconvoluído de *Mo*-CBP<sub>4</sub> (10 µg) mostrando um pico com massa molecular de 11,78 kDa.

**Figura 6 – Espectro de massa de *Mo*-CBP<sub>4</sub> reduzida por TOF-ESI-MS**

Espectro desconvoluído da cadeia menor (A) e da cadeia maior (B) de *Mo*-CBP<sub>4</sub> (5 µg) por TOF-ESI-MS.

**Tabela 2 – Sequências dos peptídeos 1, 2 e 3 obtidas a partir da digestão trípica de *Mo*-CBP<sub>4</sub>**

Peptídeo 1 - QGPGRQPDFQR						
Proteína	Organismo		Sequência		Similaridade	ID#
MO2.1 e MO2.2	<i>M. oleifera</i>	1	QGPGRQPDFQR *****	11	100%	P24303.1
2.1 protein	<i>M. oleifera</i>	1	QGPGRQPDFQR *****	11	100%	CAC69951.1
Flocculating protein	<i>M. oleifera</i>	1	QGPGRQPDFQR *****	11	100%	2111235A
2S albumin precursor (I3)	<i>M. oleifera</i>	86	QGPGRQPAFQR ***** **	96	91%	AHG99683.1
Peptídeo 2 - CCQQLR						
Proteína	Organismo		Sequência		Similaridade	ID#
2.1 protein	<i>M. oleifera</i>	12	CCQQLR 17 *****	17	100%	CAC69951.1
2S albumin precursor (I4)	<i>M. oleifera</i>	99	CCQQLR 104 *****	104	100%	AHG99684.1
2S albumin precursor (I3)	<i>M. oleifera</i>	97	CCQQLR 102 *****	102	100%	AHG99683.1
2S albumin	<i>S. indicum</i>	91	CCQQLR 96 *****	96	100%	ACI41245.1
2S albumin	<i>C. avellana</i>	87	CCQQLR 92 *****	92	100%	ACO56333.1
2S albumin precursor (I2)	<i>M. oleifera</i>	99	CCRQLR 104 ** ***	104	83%	AHG99682.1
2S albumin precursor (I1)	<i>M. oleifera</i>	99	CCRQLR 104 ** ***	104	83%	AHG99681.1
Peptídeo 3 – NISPPCR						
Proteína	Organismo		Sequência		Similaridade	ID#
2.1 protein	<i>M. oleifera</i>	18	NISPPCR 24 *****	24	100%	CAC69951.1
2S albumin precursor (I3)	<i>M. oleifera</i>	103	NISPPCR 109 *****	109	100%	AHG99683.1

#ID corresponde ao número de identificação da proteína no NCBI. \*,+ simbolizam identidade e similaridade, respectivamente, entre os resíduos dos peptídeos e aqueles depositados no banco de dados.

**Tabela 3 – Sequência do peptídeo 4 obtido a partir da digestão trípica de *Mo*-CBP<sub>4</sub>**

Peptídeo 4 - QAVQLTHQQQGQVGPQQVR						
Proteína	Organismo		Sequência		Similaridade	ID#
MO 2.1	<i>M. oleifera</i>	30	QAVQLTHQQQGQVGPQQVR	48	100%	AAB34890.1
			*****			
MO2.1 e MO2.2	<i>M. oleifera</i>	30	QAVQLTHQQQGQVGPQQVR	48	100%	P24303.1
			*****			
2.1 protein	<i>M. oleifera</i>	30	QAVQLTHQQQGQVGPQQVR	48	100%	CAC69951.1
			*****			
Flocculating protein	<i>M. oleifera</i>	30	QAVQLTHQQQGQVGPQQVR	48	100%	2111235A
			*****			
2S albumin precursor (I3)	<i>M. oleifera</i>	115	QAVQLTHQQQGQVGPQQVR	133	100%	AHG99683.1
			*****			
2S albumin precursor (I4)	<i>M. oleifera</i>	117	QAVQLAHQQQGQVGPQQVR	135	100%	AHG99684.1
			*****			
2S albumin precursor (I2)	<i>M. oleifera</i>	117	QAVQSAQQQGQVGPQQV	134	89%	AHG99682.1
			**** +*****			
2S albumin precursor (I1)	<i>M. oleifera</i>	117	QAVQSAQQQGQVGPQQV	134	89%	AHG99681.1
			**** +*****			
Mabinlin I-1 B-chain	<i>C. masaikai</i>	28	QAAHQQLYQGQIEGPRQVR	46	63%	AAB31597.1
			* ** * ** + ** ** *			

#ID corresponde ao número de identificação da proteína no NCBI. \*,+ simbolizam identidade e similaridade, respectivamente, entre os resíduos dos peptídeos e aqueles depositados no banco de dados.

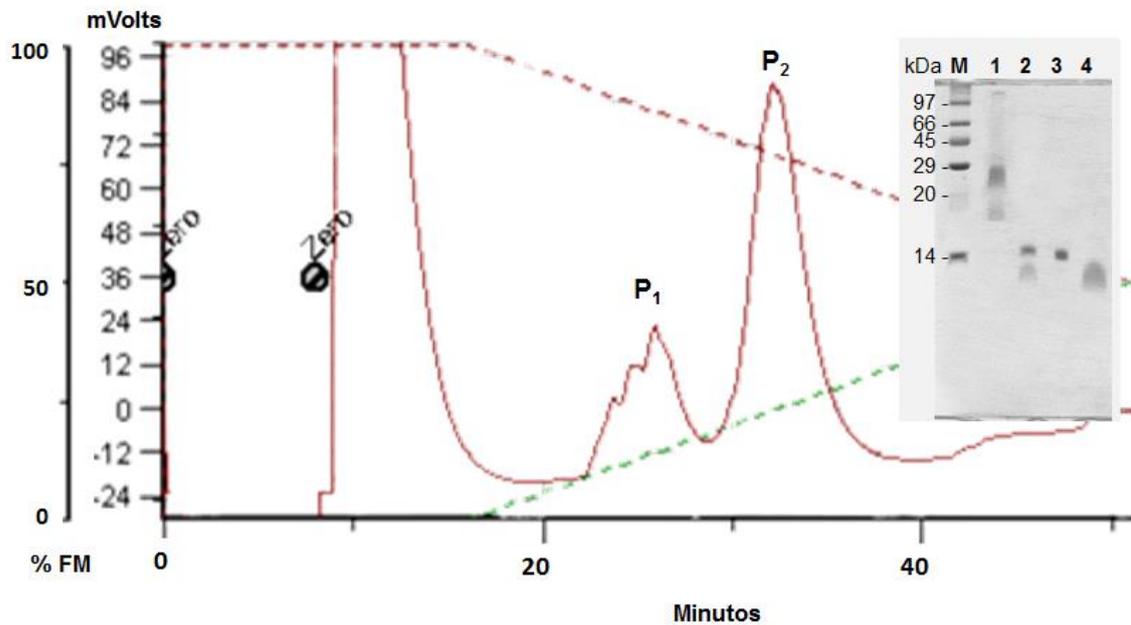
### 5.3. Determinação da sequência NH<sub>2</sub>-terminal

Previamente a determinação da sequência NH<sub>2</sub>-terminal de *Mo*-CBP<sub>4</sub>, foi necessário o isolamento das subunidades da proteína por cromatografia de fase reversa acoplada ao HPLC. Como pode ser verificado na FIGURA 7, o perfil cromatográfico da proteína reduzida e alquilada mostrou dois picos, onde, após análise em gel de poli-acrilamida 17,5%, verificou-se que o primeiro pico correspondia à cadeia menor e o segundo pico a cadeia maior.

O sequenciamento NH<sub>2</sub>-terminal da subunidade de menor massa (cadeia A) gerou uma sequência de 19 resíduos de aminoácidos (QQQQCRQGQQTHQRQRVCQ). Após uma análise comparativa em banco de dados do NCBI observou-se que a sequência gerada apresentou alta similaridade com as 4 isoformas do precursor de albumina 2S de *M. oleifera* (TABELA 4). Em relação a subunidade maior (cadeia B), foram gerados 21 resíduos da sequência NH<sub>2</sub>-terminal (ARRPAIQRCCQQLRNIQVQCR). Esta sequência apresentou alta similaridade com outras proteínas de sementes de *M. oleifera*, além de albuminas 2S de outras espécies como, *Sesamum indicum*, *Solanum lycopersicum*, *Capparis masaikai*, *Helianthus annuus* (TABELA 5).

A Figura 8 mostra o alinhamento múltiplo das cadeias A e B com as isoformas do precursor de albumina 2S (I1, I2, I3 e I4) de *M. oleifera* com números de identificação no NCBI de AHG99681.1, AHG99682.1, AHG99683.1 e AHG99684.1. Os percentuais de identidade gerados para a cadeia A em comparação com as isoformas I1, I2, I3 e I4 foram de 62%, 61%, 72% e 74%, respectivamente. Em relação à cadeia B, os percentuais de identidade foram de 62%, 62%, 71% e 90% quando alinhadas às isoformas I1, I2, I3 e I4, respectivamente.

**Figura 7 - Cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa de *Mo*-CBP<sub>4</sub>**



*Mo*-CBP<sub>4</sub> (10 mg/mL) reduzida foi aplicada em coluna C18 (4,6 mm x 100 mm), previamente equilibrada com o solvente A. Solvente A: 5% acetonitrila e ácido trifluoroacético 0,05%; Solvente B: 90% acetonitrila. Para eluição foi utilizado um gradiente linear durante 50 minutos. A linha verde representa o gradiente de acetonitrila e a vermelha o perfil de eluição da proteína a 230 nm. Fluxo: 0,2 mL/h; Frações: 1 mL/tubo. SDS-PAGE de *Mo*-CBP<sub>4</sub> em condições redutoras revelada com Coomassie Brilliant Blue R-250. Raia M – Marcadores de massa molecular. Raias 1 e 2 – *Mo*-CBP<sub>4</sub> em condições não redutora e redutora, respectivamente. Raias 3 e 4 – picos P<sub>2</sub> e P<sub>1</sub> correspondendo a cadeia maior e menor, respectivamente, de *Mo*-CBP<sub>4</sub>.

**Tabela 4 – Análise comparativa da sequência NH<sub>2</sub>-terminal da cadeia A de Mo-CBP<sub>4</sub> com proteínas depositadas no NCBI**

Cadeia A - QQQQCRQGQQTHQRQRVCQ						
Proteína	Organismo		Sequência		Similaridade	ID#
2S albumin precursor (I3)	<i>M. oleifera</i>	37	QQQRCRQ-QFQTHQRLRACQ	55	75%	AHG99683.1
			*** ** *	***** * **		
2S albumin precursor (I4)	<i>M. oleifera</i>	41	QQQQCR--QQFLTHQRLRACQ	59	71%	AHG99684.1
			***** **	***** * **		
2S albumin precursor (I2)	<i>M. oleifera</i>	37	QQQRCRH-QFQTQQLRACQ	55	65%	AHG99682.1
			*** **+	* **+*** * **		
2S albumin precursor (I1)	<i>M. oleifera</i>	37	QQQRCRH-QFQSQQLRACQ	55	60%	AHG99681.1
			*** **+	* * +*** * **		

#ID corresponde ao número de identificação da proteína no NCBI. \*,+ simbolizam identidade e similaridade, respectivamente, entre os resíduos da sequência NH<sub>2</sub>-terminal e aqueles depositados no banco de dados.

**Tabela 5 – Análise comparativa da sequência NH<sub>2</sub>-terminal da cadeia B de Mo-CBP<sub>4</sub> com proteínas depositadas no NCBI**

Cadeia B - ARRPAIQRCCQQLRNIQVQCR						
Proteína	Organismo		Sequência		Similaridade	ID <sup>#</sup>
2S albumin precursor (I4)	<i>M. oleifera</i>	91	ARRPAIQRCCQQLRNIQPRCR ***** **	111	90%	AHG99684.1
2S albumin precursor (I3)	<i>M. oleifera</i>	90	RQPAPFQRCQQLRNISPPCR * ** ***** **	109	75%	AHG99683.1
MO2.1 e MO2.2	<i>M. oleifera</i>	5	RQPDFQRCGQQLRNI * * *** *****	19	73%	P24303.1
2S albumin precursor (I2)	<i>M. oleifera</i>	90	ARRPPTLQRCRQLRNV **** * ** * ** *	106	71%	AHG99682.1
2S albumin precursor (I1)	<i>M. oleifera</i>	90	ARRPPTLQRCRQLRNV **** * ** * ** *	106	71%	AHG99681.1
2.1 protein	<i>M. oleifera</i>	5	RQPDFQRCQQLRNISPPCR * * ***** **	24	70%	CAC69951.1
2S albumin	<i>S. indicum</i>	91	CCQQLRNVDERCR *****+ **	103	69%	AAK15088.1
2S albumin-like	<i>S. lycopersicum</i>	182	QQCCQELRNIDTHCR * ****+***** +**	196	67%	XP_004244355.1
Mabinlin II B	<i>C. masaikai</i>	3	RRPALRQCCNQLR--QV **** * ** * ** *	17	65%	AAB25171.1
Basic 2S albumin	<i>H. annuus</i>	76	QQCCQELQNIQQC * ****+* ** *	89	64%	CAC81359.1

<sup>#</sup>ID corresponde ao número de identificação da proteína no NCBI. (\*) e (+) simbolizam identidade e similaridade, respectivamente, entre os resíduos da sequência NH<sub>2</sub>-terminal e aqueles depositados no banco de dados.

**Figura 8 – Alinhamento das sequências NH<sub>2</sub>-terminal correspondentes às cadeias A e B de Mo-CBP<sub>4</sub> e isoformas do precursor de albumina 2S**

```

2S albumin precursor (I4)      MAKFTLLLAIFALFLILANANVYRTTVELDEEPDDNQGGQQQQCRQQFLTHQRLRACQR      60
2S albumin precursor (I3)      MAKITLLLATFGLLLLLTNAS IYRTTVELDEEADENQ----QQRCRQQFQTHQRLRACQR      56
2S albumin precursor (I2)      MAKLTLLLATLALLVLLANAS IYRTTVELDEEPDDNQ----QQRCRHQFQTQQRLRACQR      56
2S albumin precursor (I1)      MAKLTLLLATFALLVLLANAS IYRTTVELDEEPDDNQ----QQRCRHQFQSQQRLRACQR      56
CadeiaA                          -----QQQQCRQGQOTHQQRVCC-----      19
                                   **:*:*      ::* *.*
CadeiaB                          -----                                0

2S albumin precursor (I4)      FIRRQTQGGGALEDVEDDVE--EIEEVVEPDQA--RRPAIQRCCQQLRNIQPRCRCP SL      115
2S albumin precursor (I3)      FIRRRTQGGGPLDEVEDEV D--EIEEVVEPDQGPGRQPAFQRCCQQLRNISPPCRCP SL      113
2S albumin precursor (I2)      VIRRW SQQGGPMEDVEDEIDETDEIEEVVEPDQA--RRPPTLQRCCRQLRNVS PFCRCPSL      115
2S albumin precursor (I1)      VIRRW SQQGGPMEDVEDEIGETDEIEEVVEPDQA--RRPPTLQRCCRQLRNVS PFCRCPSL      115
CadeiaA                          -----                                19
CadeiaB                          -----A--RRPAIQRCCQQLRNIQVQCR-----      21
                                   * *:*:****:****: . **

2S albumin precursor (I4)      RQAVQLAHQQGGQVGPQQV RQMYRLASNI PAICNLRPMSCFPGQQ----- 160
2S albumin precursor (I3)      RQAVQLTHQQGGQVGPQQV RQMYRVASNI PSMCNLQPMSC LFRQQSSWL 163
2S albumin precursor (I2)      RQAVQSAQQQQGQVGPQQVGHMYRVASRI PAICNLQPMRCPFRQQSS-- 163
2S albumin precursor (I1)      RQAVQSAQQQQGQVGPQQVGHMYRVASRI PAICNPQPMRCPFRQQGS-- 163
CadeiaA                          -----                                19
CadeiaB                          -----                                21

```

NH<sub>2</sub>-terminal das cadeias A (amarelo) e B (azul) de Mo-CBP<sub>4</sub> foram alinhadas com as 4 isoformas (I1, I2, I3 e I4) de 2S albumin precursor. Para o alinhamento foi utilizada a ferramenta Clustal Ômega disponível no site: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>. Aminoácidos idênticos estão indicados por asterisco (\*), substituições conservadas, por dois pontos (:), substituições semi-conservadas por um ponto (.)

## 5.4. Caracterização Espectroscópica de *Mo*-CBP<sub>4</sub>

### 5.4.1. Espectro de absorção eletrônica

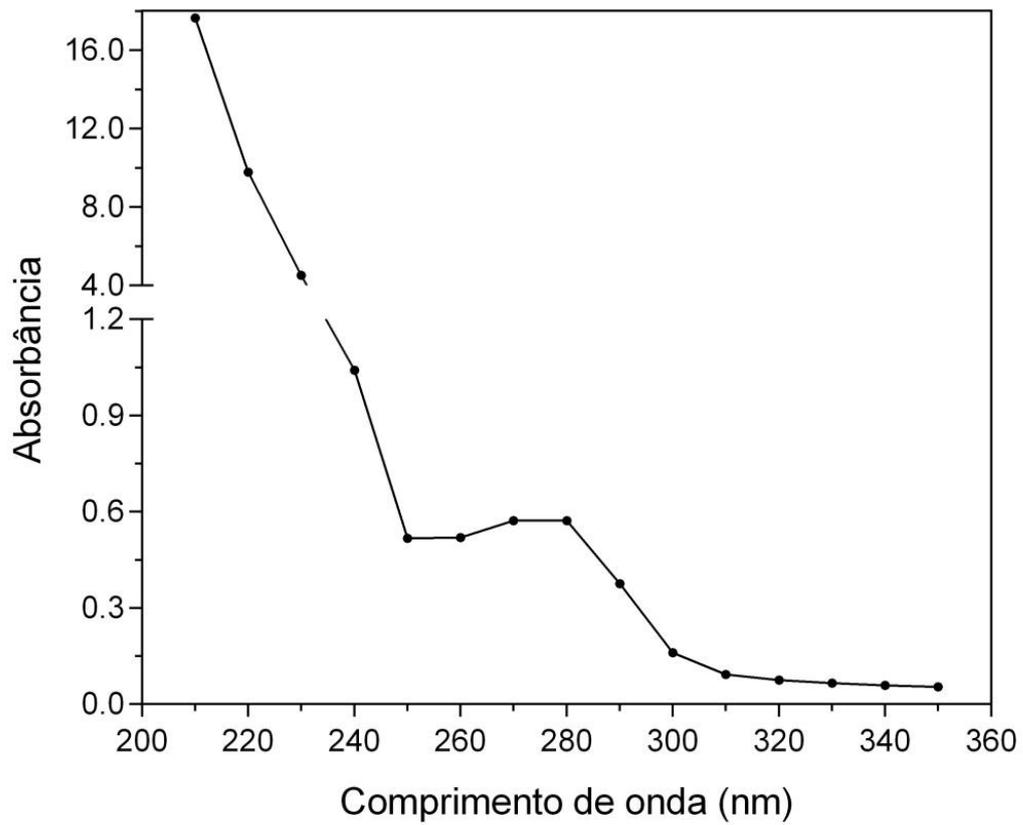
O espectro de absorção eletrônica de *Mo*-CBP<sub>4</sub> (1 mg/mL), gerado na faixa de comprimento de onda de 220 a 350 nm, mostrou um pico em 280 nm. O coeficiente de extinção molar calculado para este comprimento de onda foi 0,573 mL.cm<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> (FIGURA 9).

### 5.4.2. Espectro de dicroísmo circular

Espectro da proteína nativa (FIGURA 10), solubilizada em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0, a 25 °C, na faixa de 190 a 250 nm (região do UV distante), mostrou uma banda positiva em 195 nm, seguida por duas bandas negativas em torno de 210 nm e 220 nm. Este padrão espectral é frequentemente observado em proteínas ricas em estruturas  $\alpha$ -hélices (WOODY, 1978; SREERAMA; WOODY, 2003).

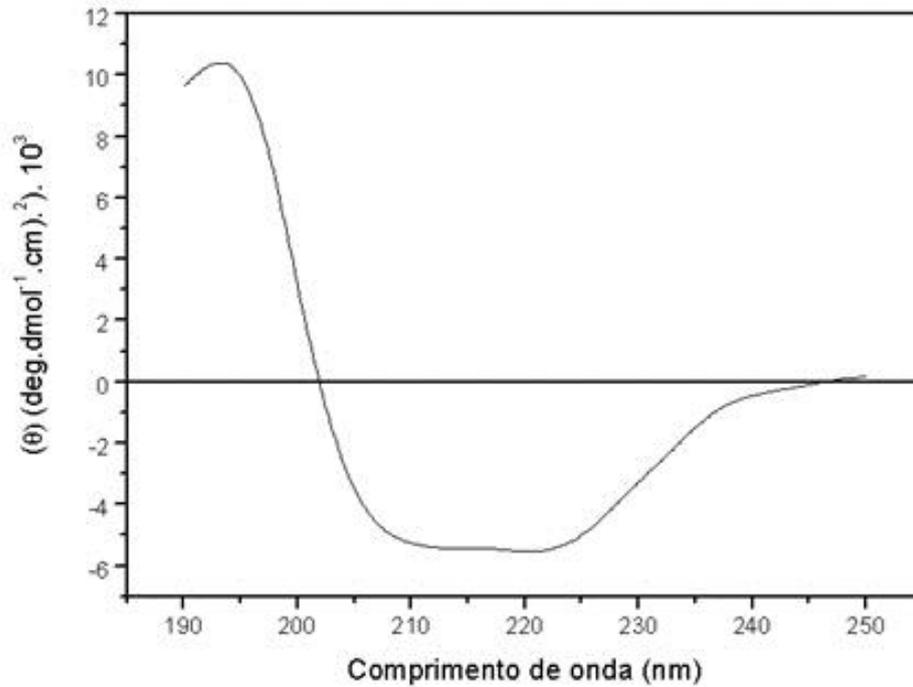
A Tabela 6 mostra as frações de estruturas secundárias de *Mo*-CBP<sub>4</sub>, geradas por SELCON3, e uma comparação com outras proteínas de sementes de *M. oleifera*. Através do programa CLUSTER, a estrutura terciária de *Mo*-CBP<sub>4</sub> foi classificada como pertencente ao grupo das proteínas alfa-beta.

Figura 9 - Espectro de absorção eletrônica de *Mo-CBP*<sub>4</sub>



A proteína (1 mg/mL) foi solubilizada em água grau Milli-Q. As absorbâncias foram registradas na faixa de comprimento de onda de 220 a 350 nm em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico.

Figura 10 - Espectro de dicroísmo circular de *Mo*-CBP<sub>4</sub> nativa



A proteína (0,4 mg/mL), solubilizada em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0, foi colocada em cubeta de quartzo retangular com 0,1 cm de passo óptico. O espectro foi coletado na região de 190 a 250 nm a 25 C°.

**Tabela 6 - Distribuição dos padrões de estrutura secundária presentes em *Mo-CBP<sub>4</sub>* e outras proteínas de sementes de *M. oleifera***

Proteína	$\alpha$ -hélice	Folhas- $\beta$	Volta- $\beta$	Não ordenada	Referência
<i>Mo-CBP<sub>4</sub></i> <sup>a</sup>	36%	15%	19%	30%	-
MO <sup>b</sup>	58%	10%	-	33%	Kwaambwa; Maikokera, 2008
MoL <sup>c</sup>	28%	23%	20%	28%	Katre <i>et al.</i> , 2008
cMoL <sup>d</sup>	46%	12%	17%	25%	Luz <i>et al.</i> , 2013

As frações de estruturas secundárias de *Mo-CBP<sub>4</sub>* foram obtidas a partir do programa SELCON3 com uma média da raiz quadrada (RMSD) de 0,057.

<sup>a</sup> A proteína (0,4 mg/mL) foi solubilizada em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0. O espectro de dicroísmo circular registrado entre 190 e 250 nm, a 25 °C.

<sup>b</sup> Proteína coagulante isolada por Ndabigengesere e Narasiah (1998).

<sup>c</sup> *Moringa oleifera lectin*.

<sup>d</sup> *Coagulant Moringa oleifera lectin*.

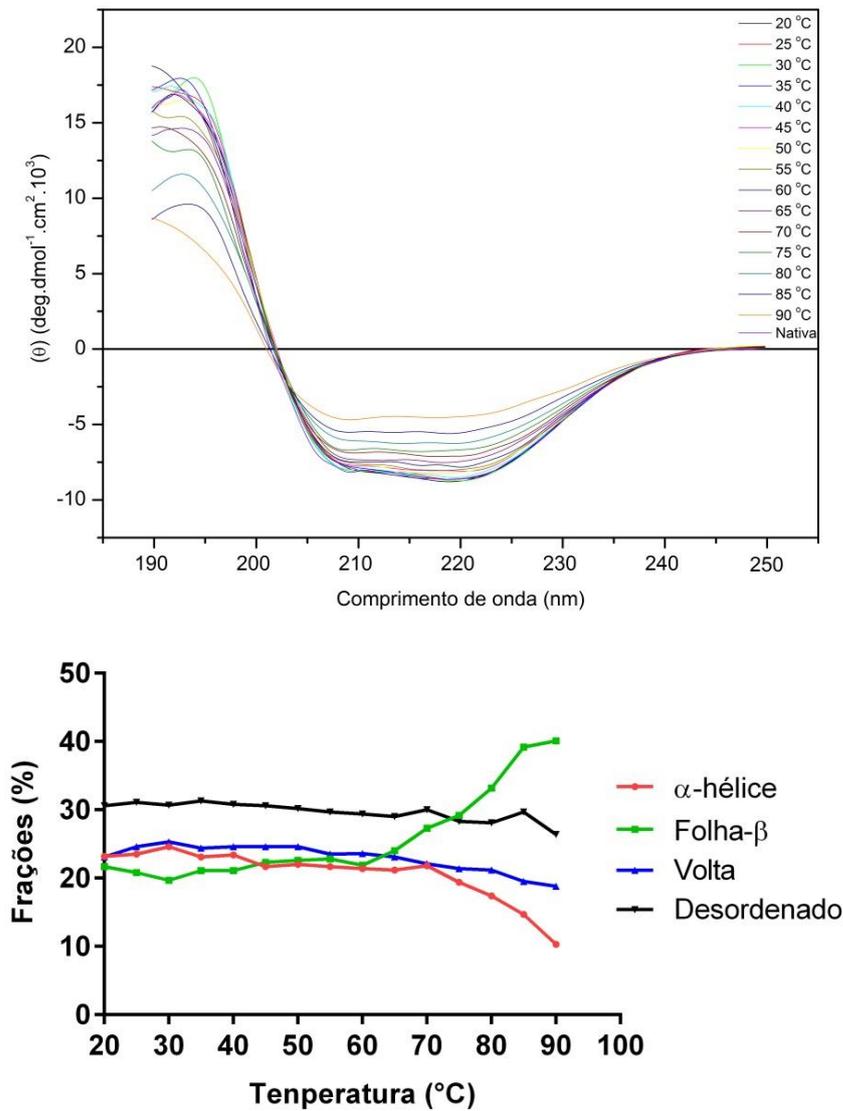
A estabilidade térmica de *Mo-CBP<sub>4</sub>* foi analisada submetendo-a ao aquecimento crescente e gradual de 20 °C a 90 °C, por 10 minutos em cada temperatura. Os espectros gerados apresentaram diferenças suaves em seus formatos (FIGURA 11A). Estimando as frações de estruturas secundárias pelo programa SELCON3 em cada temperatura, foi verificado que a partir de 70 °C, há diminuição no percentual de  $\alpha$ -hélices e aumento de folhas- $\beta$  (FIGURA 11B). De fato, quando se aumenta a temperatura de 25 °C para 90 °C, a fração de  $\alpha$ -hélices decresce de 23,5% para 10,3%, enquanto a fração de folhas- $\beta$  passa de 20,8% para 40,1%. Apesar dessas modificações conformacionais, não foi observado desenovelamento ou desnaturação, mostrando que *Mo-CBP<sub>4</sub>* possui alta estabilidade térmica.

Mudanças na estrutura secundária de *Mo-CBP<sub>4</sub>* também foram investigadas em diferentes valores de pH (3,0; 5,0; 7,0; 9,0 ou 11,0), após incubação por 30 minutos. A Figura 11A mostra que o padrão dos espectros gerados praticamente não se alterou em todos os pHs testados. Ao estimar as frações de estruturas secundárias pelo programa SELCON3, foi verificada, em geral, manutenção dos percentuais de  $\alpha$ -hélices, folhas- $\beta$ , voltas- $\beta$  e estruturas desordenadas (FIGURA 12B). Por exemplo, nos pHs 3,0 e 11,0, respectivamente, as frações de  $\alpha$ -hélice foram de 27,5% e 25,5%, e as de folhas- $\beta$  corresponderam a 19,7% e 21,3%.

#### **5.4.3. Espectro de fluorescência**

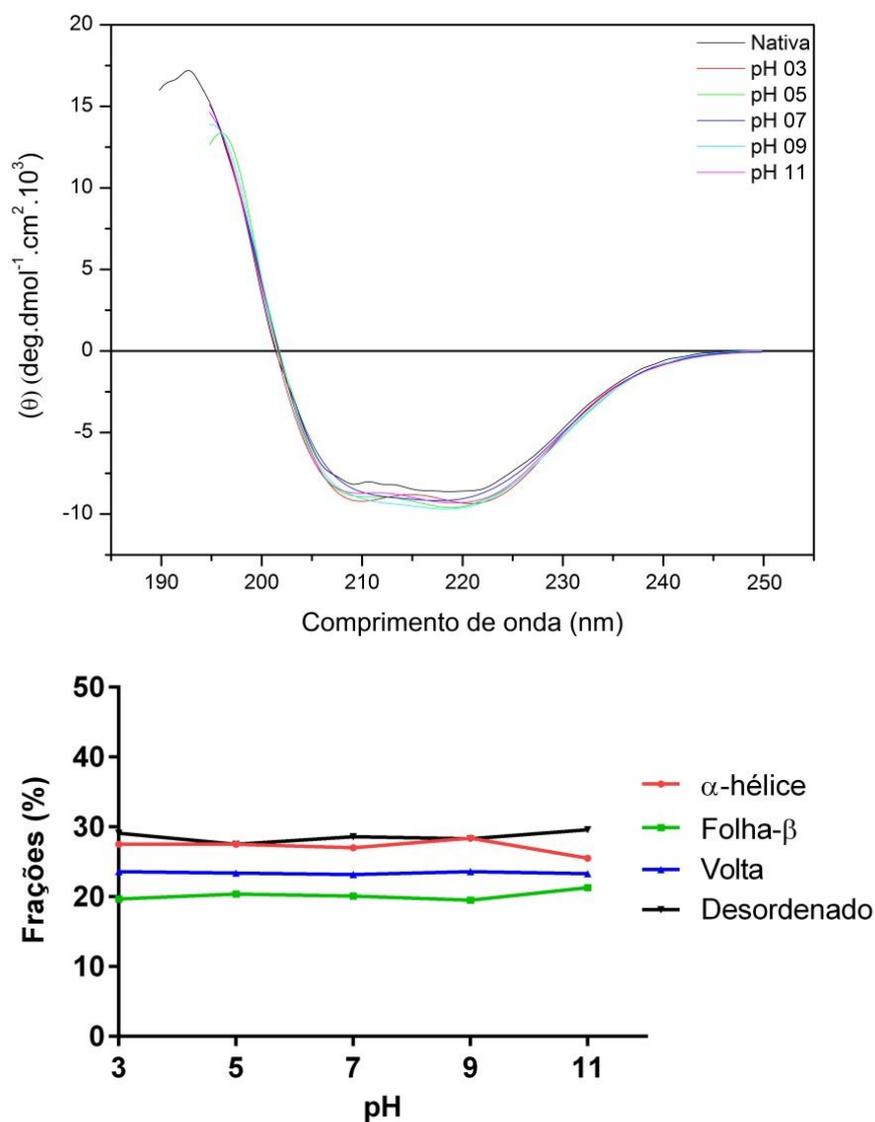
O espectro de fluorescência de *Mo-CBP<sub>4</sub>* foi obtido com a amostra solubilizada em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0 e excitado a 280 nm (para observar a emissão de fluorescência de aminoácidos aromáticos) e a 295 nm (para observar a emissão de resíduos de triptofano, especificamente). A Figura 13 mostra que quando *Mo-CBP<sub>4</sub>* foi excitada a 295 nm, exibiu um máximo de emissão de fluorescência em torno de 350 nm, indicando que as cadeias laterais de triptofanos estão expostas.

**Figura 11 – Avaliação da estabilidade térmica de *Mo-CBP<sub>4</sub>* por dicroísmo circular**



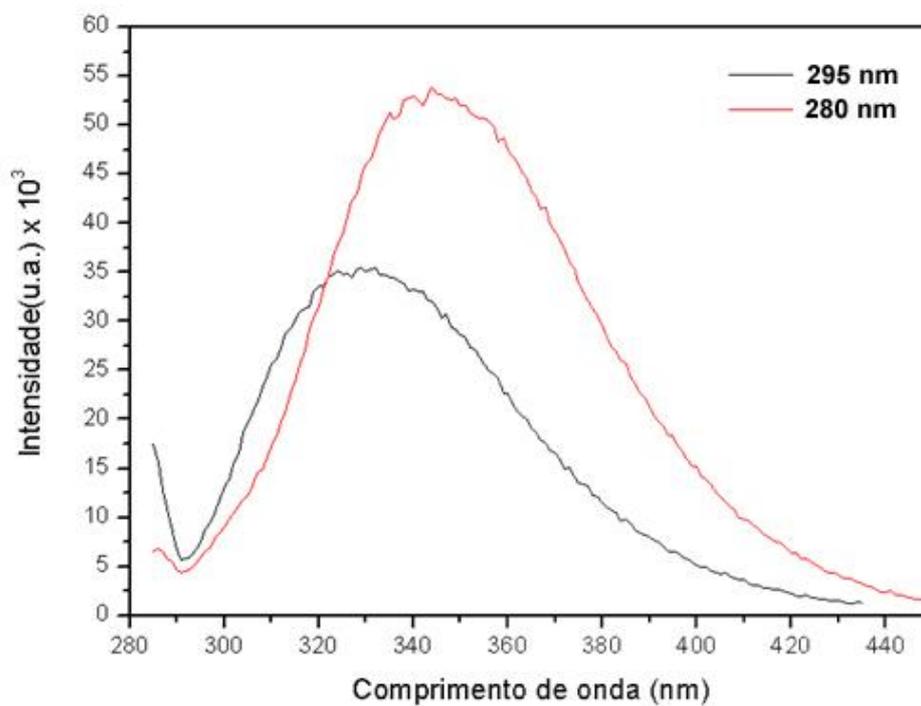
Espectros de dicroísmo circular (A) e frações de estruturas secundárias (B) de *Mo-CBP<sub>4</sub>* frente a diferentes temperaturas. A proteína (0,4 mg/mL), foi incubada em temperaturas de 20 a 90 °C, em intervalos de 5 °C. O período de incubação foi de 10 minutos para cada temperatura. O espectro foi coletado na região de 190 a 250 nm. As frações foram estimadas pelo programa SELCON3.

**Figura 12 – Avaliação da estabilidade de *Mo*-CBP<sub>4</sub> frente a diferentes pHs por dicroísmo circular**



Espectros de dicroísmo circular (A) e frações de estruturas secundárias (B) de *Mo*-CBP<sub>4</sub> frente a diferentes pHs. A proteína (0,4 mg/mL), foi solubilizada em diferentes tampões conferindo pHs 3,0; 5,0; 7,0; 9,0 e 11,0. O período de incubação foi de 30 minutos para cada tampão. O espectro foi coletado na região de 190 a 250 nm. As frações foram estimadas pelo programa SELCON3.

Figura 13 - Espectro de fluorescência de *Mo-CBP*<sub>4</sub>



A proteína (0,02 mg/mL) foi dissolvida em tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 7,0, e submetida às análises em espectrofluorímetro. A amostra foi excitada a 280 nm e 295 nm. O espectro de emissão foi coletado no intervalo de 300 a 440 nm.

## 6. DISCUSSÃO

---

A ousada proposta de uma proteína terapêutica envolve inúmeras e complexas análises que vão além dos estudos farmacológicos e toxicológicos. Em termos de produção, formulação e controle de qualidade, estas proteínas possuem muitos desafios comparados aos fármacos de baixa massa molecular, devido à alta complexidade estrutural, inerentes a estas entidades. Esta complexidade está relacionada a suas numerosas massas moleculares, possíveis conformações (primárias, secundárias, terciárias e quaternárias), solubilidades, estabilidades, tempos de meia-vida, modificações pós-traducionais e micro-heterogeneidades (CROMMELIN *et al.*, 2003; SWARTZ; KRULL, 2009; STAUB *et al.*, 2011). De fato, metodologias analíticas adicionais são necessárias para uma boa e segura caracterização destas moléculas. Nesta caracterização, devem ser incluídas as determinações de massa molecular, ponto isoelétrico, estrutura, pureza, carga e o estudo de micro-heterogeneidade, sendo que para cada propriedade, pelo menos, duas estratégias analíticas devem ser utilizadas (STAUB *et al.*, 2011).

Quanto aos estudos de estabilidade, devem ser levadas em consideração as possíveis variações químicas e físicas. As químicas são aquelas que envolvem processos de formação e/ou quebra de ligações covalentes (por exemplo, desaminação, proteólise, racemização, oxidação, etc.). Já as variações físicas, que são raras para drogas de baixa massa molecular, são aquelas causadas pela natureza polimérica das proteínas, que possibilitam a formação de superestruturas (por exemplo, estruturas secundárias, terciárias e quaternárias), fazendo com que haja mudanças estruturais independentes de variações químicas (MANNING; PATEL; BORCHARDT, 1989; GOOLCHARRAN; KHOSSRAVI; BORCHARDT, 2000; STAUB *et al.*, 2011). Assim, este Capítulo 2 consistiu em caracterizar estruturalmente *Mo-CBP<sub>4</sub>*, constituindo-se, dessa forma, como uma das etapas essenciais voltadas para o potencial uso terapêutico dessa proteína. As metodologias utilizadas consistiram de análises da massa molecular e pureza, por eletroforese e espectrometria de massas, da estrutura primária, por espectrometria de massas e degradação de Edman e, ainda, da estrutura secundária, por dicróismo circular e espectroscopia de fluorescência. Uma avaliação da estabilidade física de *Mo-CBP<sub>4</sub>* foi também realizada por técnicas espectroscópicas, incluindo variação de temperatura e do pH.

Previamente, foi realizada a purificação da proteína utilizando a metodologia descrita por Pereira e colaboradores (2011), com algumas modificações. Tais modificações realizadas tiveram como objetivos diminuir as etapas de purificação, a fim de ser obtido um maior rendimento proteico, além de reduzir o custo. De fato, com as três mudanças no protocolo (retirada da etapa de concentração de proteínas por adição de sulfato de amônio, não realização da eluição de proteínas ligantes à quitina por inclusão de *N*-acetil-D-glucosamina no tampão de equilíbrio e substituição da matriz iônica de Resource S para CM-Sepharose), foi obtido um rendimento cerca de onze vezes maior que o da metodologia anterior (passando de  $1,17 \pm 0,07$  mg/gF para  $13,06 \pm 1,06$  mg/gF). O custo foi diminuído pela retirada ou substituição de reagentes e materiais relativamente caros, como sulfato de amônio, matriz de Resource S e o açúcar *N*-acetil-D-glucosamina, este último apresentando um custo em torno de R\$ 550,00 por 100 g (cotação da empresa Sigma-Aldrich®). Um estudo recente feito pelo nosso grupo de estudo estimou o custo para purificar um miligrama de *Mo*-CBP<sub>4</sub> em U\$ 17,13, valor comparável ao de outras proteínas vegetais já comercializadas, como papaína (U\$ 12,08/mg), que é, inclusive, utilizada como composto ativo de um biofármaco (COELHO, 2013).

Eletroforese em gel de poliacrilamida, sob condições desnaturantes, foi realizada com o intuito de verificar a purificação do material, bem como determinar a massa molecular aparente de *Mo*-CBP<sub>4</sub>. Por essa técnica, a proteína em condições não redutoras se apresentou como duas bandas proteicas: uma de 28,0 kDa e outra de 17,0 kDa. Porém, quando a proteína foi tratada com  $\beta$ -mercaptoetanol, duas bandas de baixa massa molecular foram visualizadas: uma menor em torno de 5,0 kDa e outra de 7,0 kDa. Os dados apresentados para condições não redutoras corroboram com os resultados encontrados por Pereira e colaboradores (2011), porém, em condições redutoras não houve repetição dos resultados. Isso pode ser explicado pelo fato de a eletroforese apresentada anteriormente ter sido realizada em gel de poliacrilamida 15%, dificultando a visualização de cadeias polipeptídicas de baixa massa molecular. Neste trabalho, foi utilizado um gel de poliacrilamida 17,5%. Portanto, ao invés de proteína homodimérica, *Mo*-CBP<sub>4</sub>, na realidade, se apresentou como uma proteína formada por duas cadeias distintas.

A análise de *Mo*-CBP<sub>4</sub> intacta por espectrometria de massas resultou um pico majoritário, correspondendo a uma massa de 11,780 kDa. Quando a proteína foi

reduzida por ditioneitol e alquilada por iodoacetamida, foi obtido um espectro com dois picos majoritários: um com massa de 3,888 kDa e outro com 8,428 kDa, comprovando a natureza heterodimérica desta proteína.

Quanto à massa molecular, as proteínas coagulantes das sementes de *M. oleifera* parecem compartilhar algumas semelhanças. Os primeiros trabalhos com tais proteínas mostraram que as massas moleculares variavam entre 6,0 a 16,0 kDa. Apesar disso, ocorria a retenção de compostos ativos em membranas de diálise com limite de exclusão de 12,0 kDa, sugerindo a formação de dímeros, trímeros ou tetrameros dos agentes coagulantes (NDABIGENGESERE; NARASIAH; TALBOT, 1995). MoL, uma hemaglutinina de sementes de *M. oleifera*, apresentou um perfil eletroforético semelhante ao de Mo-CBP<sub>4</sub>. Na ausência do agente redutor, MoL se mostrou como duas bandas de massas moleculares aparentes de 13,6 e 27,1 kDa. porém, quando esta proteína foi submetida à filtração em gel, um único pico correspondendo a massa molecular de 14,0 kDa foi obtido, sugerindo a formação de uma espécie dimérica devido à agregação em PAGE-SDS (KATRE *et al.*, 2008). cMoL, outra lectina de sementes de *M. oleifera* com propriedade floculante, quando submetida à filtração em gel, apresentou um único pico correspondendo a massa molecular de 30,0 kDa, porém, quando a estrutura primária desta proteína foi resolvida, revelou que, na verdade, se tratava de uma molécula com massa molecular de 12,0 kDa. Assim, foi também sugerida a formação de oligômero, consistindo de três subunidades de 12,0 kDa (LUZ *et al.*, 2013).

Com a finalidade de obter dados acerca da estrutura primária de Mo-CBP<sub>4</sub>, esta foi submetida à digestão triptica, seguido de sequenciamento dos peptídeos gerados por espectrometria de massas. Peptídeos 1, 2, 3 e 4 foram gerados (TABELA 3 e 4), e todos eles mostraram identidade com a sequência depositada da proteína recombinante 2.1, derivada da clonagem de uma proteína coagulante de sementes de *M. oleifera* (BROIN *et al.*, 2002). Além disso, dois peptídeos mostraram identidade com as 4 isoformas do precursor de albumina 2S de *M. oleifera*. As sequências desses precursores foram deduzidas a partir de clones gerados da sequência NH<sub>2</sub>-terminal de Mo-CBP<sub>3</sub>, uma proteína também floculante isolada por nosso grupo de estudo (GIFONI *et al.*, 2012; BATISTA, 2013). Na tabela 3 é notado que os peptídeos 1, 2 e 3 aparecem em sequência em relação à isoforma I3 do precursor de albumina 2S,

começando na posição 86 e terminando na posição 109. Provavelmente tais peptídeos aparecem seguidos na estrutura primária de *Mo*-CBP<sub>4</sub>.

Os quatro peptídeos somam um total de 43 resíduos, o que corresponde em torno de 40% do total da proteína. Dentre os aminoácidos identificados, três são resíduos de cisteína, que podem levar à formação de pontes dissulfeto, justificando o aparecimento de duas cadeias quando a proteína é tratada com agentes redutores. Outro fato interessante é a grande quantidade de resíduos de glutamina. Estudos têm mostrado que proteínas com regiões ricas em glutamina tendem a formar oligômeros e, também, apresentar atividade floculante (BROIN *et al.*, 2002).

Acredita-se que o mecanismo de coagulação das proteínas de sementes de *M. oleifera* (incluindo *Mo*-CBP<sub>4</sub>) seja regido por forças do tipo Coulomb, ou seja, atração e repulsão de cargas. Como estas proteínas são macromoléculas catiônicas, as cargas positivas sobre suas superfícies se ligam eletrostaticamente com partículas negativas de argila e bactérias. A redução da repulsão eletrostática leva a aglomeração das partículas que formam flocos, decantam por gravidade e deixam a água livre de resíduos (GASSENSCHIMDT *et al.*, 1995). Assim, é interessante frisar que dentre os resíduos identificados nos peptídeos gerados da digestão de *Mo*-CBP<sub>4</sub>, 11,6% são de arginina e 2,3% de histidina, que contribuem para o caráter catiônico de *Mo*-CBP<sub>4</sub>, além de também poderem estar envolvidos na atividade coagulante desta proteína.

Para o sequenciamento NH<sub>2</sub>-terminal de *Mo*-CBP<sub>4</sub>, as subunidades foram previamente isoladas através de cromatografia de fase reversa acoplada ao HPLC. A sequência gerada da cadeia de menor massa (cadeia A) foi: QQQQCRQGQQTHQRQRVCQ. Em relação à cadeia de maior massa (cadeia B), os aminoácidos gerados foram: ARRP AIQRCCQQLRNIQVQCR. Somados correspondem cerca 37% da sequência total de *Mo*-CBP<sub>4</sub>. Quatro resíduos de cisteína foram identificados, sendo 2 na cadeia A e 3 na cadeia B, possibilitando a formação de pontes dissulfeto. O aminoácido mais abundante foi glutamina, somando um total de 15 resíduos, seguido de arginina correspondendo a 8 resíduos.

A análise comparativa das sequências geradas mostrou que a cadeia A apresentou alta similaridade com todos os precursores de albumina 2S de sementes de *M. oleifera*. A sequência da cadeia B, além dessas isoformas, também apresentou similaridade com outras proteínas (floculantes) de *M. oleifera*, além de outras

albuminas 2S, incluindo a mabinlin. Albuminas 2S são proteínas de estoque vastamente distribuídas em sementes de plantas. Geralmente possuem baixa massa molecular (12-15 kDa) e são compostas de 2 cadeias polipeptídicas diferentes ligadas por pontes dissulfeto. A principal característica da sequência de aminoácidos dessas proteínas é a distribuição de seus 8 resíduos de cisteína em um padrão conservado (...C...C.../...CC...CXC...C...C). Em adição às duas pontes dissulfeto intercadeia, existem mais 2 pontes intracadeia que conferem estabilidade a estas proteínas (PANTOJA-UCEDA *et al.*, 2002).

Como as sequências das duas cadeias apresentaram alta similaridade com as isoformas do precursor de albumina 2S, foi realizado o alinhamento destas sequências utilizando a ferramenta Clustal Ômega. As sequências destas isoformas são provenientes da pré-proteína de *Mo*-CBP<sub>3</sub>, onde os 30 primeiros aminoácidos correspondem ao peptídeo sinal, seguido da cadeia A com cerca de 40 resíduos, um *loop* de 18 aminoácidos que liga as duas cadeias e por último a cadeia B com 67 resíduos (FREIRE, 2013). A sequência NH<sub>2</sub>-terminal da cadeia A de *Mo*-CBP<sub>4</sub> alinhou na posição que corresponde à cadeia A de *Mo*-CBP<sub>3</sub>, chegando a 73% de identidade com a isoforma I4. Em adição, a sequência gerada pelo sequenciamento NH<sub>2</sub>-terminal da cadeia B de *Mo*-CBP<sub>4</sub> também alinhou na posição correspondente à subunidade maior de *Mo*-CBP<sub>3</sub> com um percentual de identidade de 90% para a isoforma I4. Estes dados indicam a alta similaridade entre essas duas proteínas.

Uma das técnicas mais utilizadas para estudar a estrutura secundária de uma proteína e suas variações é a espectroscopia de dicroísmo circular. Como esta macromolécula possui centros assimétricos ou quirais, a absorção da luz circularmente polarizada à direita é diferente da esquerda, revelando a conformação estrutural que ela pode adquirir ( $\alpha$ -hélices, folhas- $\beta$ , voltas ou estruturas desordenadas), além de possibilitar a obtenção das frações destas conformações na estrutura global da molécula (GREENFIELD, 2006). Espectroscopia de dicroísmo circular também é vastamente empregada na indústria farmacêutica para elucidar estruturas e alterações durante a purificação e formulação de biofármacos (STAUB *et al.*, 2011). Nesse contexto, *Mo*-CBP<sub>4</sub> foi submetida a esta técnica para elucidar sua estrutura secundária, além de analisar a estabilidade quanto a variação de temperatura e pH.

O perfil espectral de *Mo*-CBP<sub>4</sub> na região do UV distante (190 - 250 nm), mostrou uma banda positiva em 195 nm e duas bandas negativas em 210 nm e 220 nm, características de proteínas ricas em estruturas  $\alpha$ -hélices. Tal fato foi confirmado ao estimar, a partir dos espectros obtidos, a composição de estruturas secundárias da proteína. Para *Mo*-CBP<sub>4</sub> nativa, em pH 7,0 a 25 °C, foram estimados 35% de  $\alpha$ -hélices, 15% de folhas- $\beta$ , 19% de voltas e 30% de estruturas desordenadas. Estes dados foram obtidos através da utilização do programa SELCON3, escolhido por ter gerado uma média da raiz quadrada normalizada menor que 0,1 (NRMSD = 0,057), ou seja, onde o espectro calculado foi o mais próximo do experimental. O programa CLUSTER mostrou que *Mo*-CBP<sub>4</sub> pertence à classe de estrutura terciária do tipo alfa/beta.

Outras proteínas de *M. oleifera*, incluindo duas lectinas (MoL e cMoL), apresentaram distribuição de padrões de estruturas secundárias semelhantes a de *Mo*-CBP<sub>4</sub>, com predominância de  $\alpha$ -hélices (KATRE *et al.*, 2008; LUZ *et al.*, 2013). Porém, ao contrário destas duas hemaglutininas, a proteína objeto deste estudo não foi capaz de aglutinar diretamente eritrócitos de coelho e do homem (PEREIRA *et al.*, 2011).

Sabe-se que a estabilidade funcional de uma proteína geralmente está acompanhada de sua estabilidade estrutural. Assim, variações na estrutura secundária de *Mo*-CBP<sub>4</sub> foram monitoradas por dicroísmo circular. Primeiro, a proteína foi incubada por 10 minutos em diferentes temperaturas. Os espectros gerados apresentaram apenas diferenças suaves em seus formatos, mantendo um perfil do espectro com uma banda positiva em torno de 195 nm e duas bandas negativas em 210 e 220 nm, mesmo quando a proteína foi aquecida a 90 °C, evidenciando sua estabilidade estrutural. Porém, quando foram estimadas as frações de padrões secundários para todas as temperaturas testadas, foi observado que a partir de 75 °C há uma inversão da conformação  $\alpha$ -hélice para folhas- $\beta$ . Estruturas como volta e desordenada mantiveram suas frações ao longo do experimento. Apesar dessas modificações conformacionais, não foi observado desenovelamento ou desnaturação, mostrando que *Mo*-CBP<sub>4</sub> possui alta estabilidade térmica.

Quanto à estabilidade estrutural de *Mo*-CBP<sub>4</sub> frente à variação de pH, o perfil dos espectros obtidos mostrou manutenção do padrão original, com nenhum ou pouco desvio. Quando estimadas as frações de estruturas secundárias, mesmo entre

os extremos de pH testados não houve mudanças significativas nas quantidades de  $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$ , confirmando a alta estabilidade da proteína.

Estudos anteriores mostraram que com *Mo*-CBP<sub>4</sub> apresentou atividade antinociceptiva quando administrada oralmente, inibindo em 50% as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Isto demonstra que, mesmo em extremos de pH encontrados ao longo do trato gastrointestinal (em camundongos, o pH do estômago e do intestino delgado estão em torno de 3,0 e 6,0, respectivamente), a proteína se manteve resistente e íntegra o bastante para apresentar tal ação (MCCONNELL; BASIT; MURDAN, 2007; PEREIRA *et al.*, 2011). As análises com a técnica de dicroísmo circular apresentadas neste trabalho confirmam tal resistência. Estabilidade desta proteína também foi testada simulando variação no tempo de prateleira e temperatura de armazenamento. Nos testes realizados, *Mo*-CBP<sub>4</sub> foi armazenada por 3 ou 6 meses, em três diferentes temperatura, -20 °C, 4 °C e 25 °C. Após os tempos de armazenamento, parâmetros como solubilidade, capacidade de ligação à quitina e atividade antinociceptiva foram comparados com os resultados obtidos com a proteína não armazenada. Os resultados obtidos mostraram que *Mo*-CBP<sub>4</sub> foi estável frente ao armazenamento e que, embora tenha ocorrido uma pequena diminuição na solubilidade e na potência, a proteína ainda apresentou atividade biológica significativa (COELHO, 2013).

Estabilidade a extremos de pH e altas temperaturas é uma característica comum às proteínas isoladas de semente de *M. oleifera*. A proteína coagulante (MO), isolada por Ghebremichael e colaboradores (2005), manteve sua atividade floculante mesmo depois de aquecida a 95 °C, por 5 horas. Caracterização espectroscópica desta proteína confirmou a termoestabilidade, além de mostrar que mudanças no pH do meio não era capaz de afetar sua estrutura secundária. A hemaglutinina MoL também manteve sua conformação estrutural e capacidade de aglutinar eritrócitos quando submetida a variações de pH e temperatura (KATRE *et al.*, 2008). cMoL manteve-se ativa quando o pH do meio variou de 4,0 – 9,0, ou quando aquecida a 100 °C por 7 horas (SANTOS *et al.*, 2009). Ao analisar a estrutura secundária desta proteína por dicroísmo circular, Luz e colaboradores (2013) verificaram, assim como para *Mo*-CBP<sub>4</sub>, uma diminuição do conteúdo de  $\alpha$ -hélices, seguido de um aumento na fração de folhas- $\beta$ , quando submetida a altas temperaturas (a partir de 80 °C), não havendo mudanças quando submetida a condições acídicas ou alcalinas. Outra

proteína de semente de *M. oleifera* isolada por nosso grupo de estudo, *Mo-CBP<sub>3</sub>*, mostrou-se altamente estável, desde que sua atividade antifúngica foi mantida mesmo após o tratamento térmico a 100 °C por 1 hora ou submetida a variações de pH do meio, de 2,0 até 12,0 (GIFONI *et al.*, 2012; BATISTA, 2013).

Os resultados expostos neste capítulo sugerem que *Mo-CBP<sub>4</sub>* é uma proteína com grande potencial de uso futuro, talvez como biofármaco, devido à sua alta estabilidade frente a variações de temperatura e pH, além da sua alta resistência à hidrólise por enzimas digestivas. Estudos mais aprofundados acerca da obtenção de sua sequência completa e resolução de sua estrutura terciária deverão ser realizados, a fim de que possam contribuir para o maior conhecimento de suas potenciais utilizações e riscos.

## 7. CONCLUSÃO

---

*Mo-CBP<sub>4</sub>* é uma proteína ligante à quitina de sementes de *M. oleifera*, formada por duas cadeias polipeptídicas distintas (em torno de 3,9 e 8,4 kDa), unidas por pontes dissulfeto. Dados estruturais indicam que ser essa proteína rica em resíduos de glutamina e aminoácidos básicos, tratando-se de uma proteína alfa-beta, com alta estabilidade frente a variações de temperatura e pH.



## **Capítulo 3**

**Potencial Terapêutico de *Mo*-CBP<sub>4</sub>  
nos Processos de Inflamação e Dor**

## 1. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA

---

A inflamação é uma ferramenta essencial da imunidade inata humana para remover patógenos e reparar danos em tecidos. Contudo, existe uma linha tênue entre os efeitos benéficos e prejudiciais do processo inflamatório. Uma resposta descontrolada pode acarretar em danos ao hospedeiro, tanto em uma situação aguda, como em uma situação crônica, gerando diversas enfermidades, incluindo artrite reumatoide, doenças cardiovasculares, diabetes e doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer (TABAS; GLASS, 2013). Por este motivo, há grande relevância na utilização de drogas anti-inflamatórias para conter os danos causados pelo processo inflamatório.

Existem muitas e variadas drogas anti-inflamatórias e analgésicas no mercado. Porém, é incessante a busca por novos fármacos com maior potência e menos efeitos adversos e toxicidade. Uma fonte bastante promissora são as plantas medicinais, com um arsenal de substâncias capazes de tratar diversas enfermidades (GAUTAM; JACHAK, 2009).

Dentre essas moléculas vegetais bioativas, destacam-se as lectinas, que são proteínas capazes de se ligar a carboidratos, inclusive àqueles determinantes de alguma atividade biológica em células humanas, tornando-as alvo de grandes descobertas de interesse clínico e de potenciais aplicações biotecnológicas (PUSZTAI; BARDOCZ; EWEN, 2008; LIU; BIAN; BAO, 2010). Estudos anteriores mostraram, por exemplo, que lectinas vegetais que se ligam a açúcares como *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) e glucose-manose foram capazes de interferir em parâmetros importantes da resposta inflamatória, como a infiltração neutrofílica e liberação de mediadores químicos (MATSUDA *et al.*, 1994; ASSREUY *et al.*, 1997; ALENCAR *et al.*, 1999; MOTA *et al.*, 2006; NUNES *et al.*, 2009).

Seguindo essa tendência, *M. oleifera* se destaca pelo seu valor medicinal, uma vez que extratos de todas as partes desta planta mostraram propriedades farmacológicas reconhecidas pelo uso popular e corroboradas pela comunidade científica (FERREIRA *et al.*, 2008). Em particular, propriedades anti-inflamatória e antinociceptiva foram reportadas para raízes, folhas e sementes (CÁCERES *et al.*, 1992; SULAIMAN *et al.*, 2008; SASHIDHARA *et al.*, 2009). Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa isolou uma lectina ligante à quitina de sementes desta planta, com

potente atividade anti-inflamatória e antinociceptiva, denominada *Mo-CBP<sub>4</sub>*. Tal proteína, na dose de 10 mg/kg, foi capaz de inibir em 98,9% (quando administrada pela via intraperitoneal) e 52,9% (após aplicação pela via oral), o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos, um modelo experimental de dor inflamatória tradicionalmente utilizado como ferramenta de triagem para descoberta de novos agentes anti-inflamatórios e analgésicos. Além disso, *Mo-CBP<sub>4</sub>* apresentou resistência à proteólise em ensaio de digestibilidade *in vitro*, utilizando pepsina, tripsina e quimotripsina, individualmente e em conjunto, simulando o trato gastrointestinal. Diante do exposto, *Mo-CBP<sub>4</sub>* mostra-se como uma molécula bastante promissora para ser utilizada como agente terapêutico contra os processos de inflamação e dor, principalmente pela possibilidade de ser administrada pela via oral. No entanto, é necessária a caracterização mais aprofundada da ação farmacológica de *Mo-CBP<sub>4</sub>*, a fim de avaliar o seu potencial biotecnológico. Dessa forma, são perguntas que guiarão esta proposta:

*Qual a potência farmacológica observada para Mo-CBP<sub>4</sub>, considerando a via de administração oral, em relação aos modelos mais específicos de nocicepção e inflamação experimental?*

*A atividade anti-inflamatória de Mo-CBP<sub>4</sub> está relacionada com a sua capacidade de interagir com carboidrato?*

*Quais os efeitos de Mo-CBP<sub>4</sub> sobre a liberação de mediadores pró- e anti-inflamatórios?*

*A analgesia exibida por Mo-CBP<sub>4</sub> está relacionada com a sua atividade anti-inflamatória ou é decorrente de uma ação central, como aquela apresentada por sedativos?*

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1. Geral

Avaliar o efeito de *Mo*-CBP<sub>4</sub> na resposta inflamatória e nociceptiva, além de estudar os mecanismos envolvidos.

### 2.2. Específicos

- Avaliar o efeito de *Mo*-CBP<sub>4</sub> sobre a migração de neutrófilos induzida por carragenina, quando esta lectina é administrada intravenosamente;
- Investigar o potencial anti-inflamatório de *Mo*-CBP<sub>4</sub> quando administrada via oral, utilizando modelo de peritonite induzida por zymosan, avaliando o efeito sobre a migração de neutrófilos e liberação de citocinas pró- e anti-inflamatórias;
- Analisar o envolvimento do sítio lectínico na atividade anti-inflamatória de *Mo*-CBP<sub>4</sub>;
- Avaliar a estabilidade da lectina, analisando a atividade anti-inflamatória após tratamento térmico;
- Avaliar a atividade antinociceptiva de *Mo*-CBP<sub>4</sub>, utilizando o teste da formalina;
- Avaliar a atividade anti-hipernociceptiva de *Mo*-CBP<sub>4</sub> no modelo de sensibilização da pata induzida por agente inflamatório inespecífico (carragenina) e específico (PGE<sub>2</sub> e epinefrina), além de investigar o efeito sobre a migração de neutrófilos;
- Investigar o efeito de *Mo*-CBP<sub>4</sub> sobre a atividade motora dos animais, utilizando o modelo do campo aberto.

### 3. MATERIAIS

---

#### 3.1. Proteína ligante à quitina de *M. oleifera* (Mo-CBP<sub>4</sub>)

Mo-CBP<sub>4</sub> foi purificada tal como descrito no item 4.1 (Capítulo 2). Para os experimentos, Mo-CBP<sub>4</sub> liofilizada foi solubilizada em salina 0,15 M e centrifugada a 5000 x g, por 5 minutos, em temperatura ambiente.

#### 3.2. Reagentes químicos

Aminoguanidina, carragenina, zymosan, *N*-acetil-D-glucosamina, epinefrina, indometacina, sulfanilamida, dicloreto de *N*-naftil-etilenodiamina, brometo de hexadeciltrimetilamônio e prostaglandina E<sub>2</sub> foram obtidos de Sigma Chemical Co, St. Louis, EUA.

Anticorpo biotilado de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-10 foram obtidos de Dako (Copenhague, Dinamarca). Ácido diaminoetileno e Tween 20 foram obtidos da Merck (Frankfurt, Alemanha).

Outros reagentes utilizados incluíram diazepam (Roche, Brasil); Panótico Rápido (Laborclin, Brasil) e heparina (Cristália, Brasil).

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

#### 3.3. Animais

Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, com massa corporal entre 200 e 300 g, e camundongos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas, com massa corpórea variando entre 20 e 30 g foram fornecidos pelo Biotério Central da UFC e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina dessa mesma Instituição. Os animais foram mantidos em caixas plásticas contendo água e ração *ad libitum* e aclimatados (25 °C) em ciclo claro/escuro de 12 horas, antes da realização dos experimentos. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados. Após o término dos protocolos

experimentais, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical (camundongos) ou inalação de halotano (ratos).

Os protocolos experimentais foram realizados em conformidade com as diretrizes atuais para o cuidado de animais de laboratório e com as diretrizes éticas para investigações experimentais da dor em animais conscientes, revisto e aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa com Animais (CEPA) da UFC, com o número de protocolo 86/10.

## 4. MÉTODOS

---

### 4.1. Atividade anti-inflamatória de *Mo-CBP<sub>4</sub>*

#### 4.1.1. Avaliação do efeito de *Mo-CBP<sub>4</sub>*, via endovenosa, sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina

Ratos Wistar machos (n = 5) foram tratados previamente com 0,5 mL de uma solução de *Mo-CBP<sub>4</sub>* nas doses de 0,1, 1 ou 10 mg/kg ou salina (controle negativo), via endovenosa. Trinta minutos depois, os animais receberam intraperitonealmente o estímulo inflamatório carragenina (Cg; 500 µg/cavidade), dissolvida em 1 mL de salina estéril. Quatro horas depois, o lavado peritoneal foi obtido injetando 10 mL de salina contendo 5 UI/mL de heparina na cavidade peritoneal dos animais. O abdômen do animal foi massageado suavemente e, através de uma incisão, foram coletados cerca de 7 mL do fluido peritoneal com pipeta de Pasteur de plástico.

As contagens total e diferencial dos leucócitos foram realizadas seguindo a metodologia descrita por Souza e Ferreira (1985). Para tal, 20 µL do fluido coletado foram diluídos em 380 µL de reagente de Turk (ácido acético 2%; violeta genciana 0,2%) e, após homogeneização, a contagem total dos leucócitos foi realizada em microscópio óptico utilizando a câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi realizada utilizando esfregaços corados em lâminas. Neste procedimento, 50 µL do lavado foram submetidos à centrifugação a 400 x g, durante 10 minutos (citocentrífuga, modelo 2000D - Cientec). Após esse procedimento, as células foram coradas utilizando panótico rápido e a contagem realizada em microscópio óptico binocular (modelo 021, Quimis®). Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. do número de neutrófilos x 10<sup>3</sup>/mL de fluido peritoneal.

#### 4.1.2. Avaliação do efeito de *Mo-CBP<sub>4</sub>*, via oral, sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por zymosan

A metodologia usada foi descrita por Doherty e colaboradores (1985), com algumas alterações. Camundongos Swiss fêmeas (n = 5) foram tratados previamente

com *Mo*-CBP<sub>4</sub> (10, 20 e 40 mg/kg) ou salina (controle negativo), via oral por gavagem em um volume de 0,5 mL. Uma hora depois, os animais receberam intraperitonealmente o estímulo inflamatório zymosan (Zy; 2,0 mg/cavidade) dissolvido em 300 µL de salina estéril. Quatro horas depois da administração de zymosan, foi obtido o lavado peritoneal injetando 3 mL de salina contendo 5 UI/mL de heparina na cavidade peritoneal dos animais. O abdomen do animal foi massageado suavemente e, através de uma incisão, foram coletados cerca de 2 mL do fluido peritoneal com pipeta de Pasteur de plástico. Dexametasona (Dex; 1,0 mg/kg s.c.) foi administrada 30 minutos antes do agente inflamatório, representando o controle positivo por se tratar de uma droga anti-inflamatória padrão.

As contagens total e diferencial dos leucócitos foram realizadas como descrito anteriormente. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. do número de neutrófilos x 10<sup>3</sup>/mL de fluido peritoneal.

#### *4.1.2.1. Avaliação da atividade anti-inflamatória de Mo-CBP<sub>4</sub> após aquecimento*

Para avaliar a estabilidade de *Mo*-CBP<sub>4</sub> frente à desnaturação térmica, a proteína foi solubilizada em salina e aquecida por 1 hora a 100 °C. Após esse procedimento, camundongos foram tratados com *Mo*-CBP<sub>4</sub>, aquecida ou não, na dose de 40 mg/kg, via oral, 1 hora antes da injeção i.p. do agente inflamatório zymosan. A migração dos neutrófilos foi avaliada conforme descrito anteriormente no item 4.1.2. Salina e dexametasona (1,0 mg/kg, s.c.) foram utilizadas como controle negativo e positivo, respectivamente. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão do número de neutrófilos x 10<sup>3</sup>/mL de fluido peritoneal.

#### *4.1.2.2. Avaliação da participação do sítio de ligação ao carboidrato na atividade anti-inflamatória de Mo-CBP<sub>4</sub>*

Para avaliar se o sítio lectínico de *Mo*-CBP<sub>4</sub> estaria envolvido no seu mecanismo de ação anti-inflamatória, a proteína foi previamente incubada com o açúcar específico, *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) 0,1 M, por 1 hora, à temperatura ambiente. Em seguida, os animais foram tratados com a proteína (40 mg/kg, v.o.), incubada ou não com GlcNAc, 1 hora antes da administração do zymosan. Um grupo

foi tratado apenas com o açúcar 1 hora antes da injeção do agente inflamatório, para descartar qualquer atividade inerente a tal substância. A migração dos neutrófilos foi avaliada conforme descrito anteriormente no item 4.1.2. Salina e dexametasona (1,0 mg/kg, s.c.) foram utilizadas como controle negativo e positivo, respectivamente. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão do número de neutrófilos  $\times 10^3$ /mL de fluido peritoneal.

#### 4.1.2.3. Avaliação do efeito de *Mo-CBP*<sub>4</sub> sobre a liberação de citocinas pró- e anti-inflamatórias

Animais foram previamente tratados com *Mo-CBP*<sub>4</sub> (40 mg/kg) via oral e, 1 hora depois, o agente inflamatório zymosan (2,0 mg/cavidade) foi injetado intraperitonealmente. Salina foi usada como controle negativo. Duas horas depois da indução da peritonite, os camundongos foram levemente anestesiados com éter etílico e amostras de sangue foram coletadas através do plexo retro-orbital, utilizando capilares contendo EDTA (2%). O soro foi obtido por centrifugação do sangue durante 10 minutos, a 600 x g. O fluido peritoneal foi obtido como descrito anteriormente.

Para determinar as concentrações de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10, foi utilizado o ensaio de imunoadsorção ligada à enzima (ELISA), baseado em protocolo já descrito (Cunha *et al.*, 2000). Placas de microtitulação (96 poços) foram sensibilizadas com 50  $\mu$ L de tampão PBS, contendo 2,0  $\mu$ g/mL de anticorpo monoclonal anti-IL-1 $\beta$ , anti-TNF- $\alpha$  ou anti-IL-10 de soro de carneiro. As placas foram incubadas por 12 horas a 4 °C e, após esse período, lavadas de 3 a 5 vezes com tampão PBS contendo 0,05% de Tween 20. Em seguida, foram adicionados 50  $\mu$ L de albumina sérica bovina 1% (solução de bloqueio) e procedida incubação durante 2 horas à temperatura ambiente. As placas foram novamente lavadas como descrito anteriormente e, em seguida, adicionadas das amostras testes (fluido e soro), em triplicata. Curvas-padrão foram obtidas utilizando concentrações crescentes de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10, diluídas em PBS-Tween. Após um período de incubação de 24 horas a 4 °C, foram adicionados os anticorpos monoclonais biotinizados anti-IL-1 $\beta$ , anti-TNF- $\alpha$  e anti-IL-10, diluídos BSA 1% e Tween 0,05%. Após 1 hora à temperatura ambiente, as placas foram lavadas e foram adicionados 50  $\mu$ L do complexo HRP – avidina, diluído 1:5000. A reação foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M e a absorbância foi medida a 490 nm em

espectrofotômetro. As concentrações de citocinas contidas nas amostras foram determinadas a partir da curva padrão. Os resultados foram expressos em picogramas de citocinas/mL de soro ou de fluido peritoneal.

## **4.2. Atividade antinociceptiva de *Mo-CBP<sub>4</sub>***

### ***4.2.1. Avaliação do efeito de *Mo-CBP<sub>4</sub>* sobre a nocicepção induzida por formalina***

O teste da formalina foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Hunskaar e Hole (1987). Para tal, camundongos foram tratados com a proteína em doses crescentes (3,5, 10 e 20 mg/kg), via i.p. Salina foi utilizada como controle negativo. Passados 30 minutos, formalina 2,5% foi administrada (20 µL) na região subplantar da pata direita dos animais. Imediatamente após a injeção, os animais foram colocados, individualmente, em funis de vidro de 20 cm de diâmetro, com espelhos localizados na parte traseira, para facilitar a observação. O parâmetro analisado foi o tempo de lambertura da pata, durante os primeiros 5 minutos (fase da dor neurogênica) e de 20 a 25 minutos (fase da dor inflamatória). Os resultados foram expressos pelo tempo de lambertura (em segundos) ± desvio padrão

### ***4.2.2. Avaliação do efeito de *Mo-CBP<sub>4</sub>* sobre a hipernocicepção mecânica induzida por carragenina***

Para avaliar a atividade anti-hiperalgésica de *Mo-CBP<sub>4</sub>*, foi utilizado o método do von Frey eletrônico, modificado por Cunha e colaboradores (2004). Nesse teste, é utilizado um anesthesiômetro (Insight) contendo um transdutor digital de força, expressa em gramas (g). Ao transdutor é adaptada uma ponteira de 0,05 mm<sup>2</sup> utilizada para estimular diretamente a pata. Os animais são colocados individualmente em caixas de acrílico medindo 12 x 10 x 17 cm com assoalho de malha de arame não maleável, mantendo-os por 10 minutos para adaptação ao ambiente. Um espelho é posicionado 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar o estímulo da pata. Utilizando a ponteira em ângulo reto, é aplicada uma pressão gradual e crescente na região central da pata traseira do animal, o qual provoca uma resposta de flexão caracterizada pela retirada da pata. Após observação desta resposta, o

estímulo é interrompido. A intensidade de hipernocicepção é quantificada através da variação da pressão aplicada na pata ( $\Delta$ , limiar de estímulo em gramas). Esta variação é obtida a partir da subtração do valor medido antes do tratamento ( $T_0$ , medida basal) e após a administração do estímulo ( $T_F$ ). São realizadas três medidas distintas para cada animal, sendo calculada a média aritmética destes valores.

Utilizando essa abordagem, camundongos ( $n = 5$ ) foram previamente desafiados no von Frey eletrônico, para a medida basal da força aplicada na pata. Após isso, os animais foram tratados com *Mo*-CBP<sub>4</sub> (20, 40 e 80 mg/kg) ou salina via oral, 1 hora antes da sensibilização com carragenina (Cg; 300  $\mu$ g/pata; i.pl.). Indometacina (5 mg/kg; i.p.) foi administrada 30 minutos antes da carragenina, correspondendo ao controle positivo. Depois de 1, 3 e 5 horas da administração do estímulo inflamatório, os animais foram submetidos ao estímulo mecânico no von Frey eletrônico e a pressão foi anotada para esses tempos. A intensidade de hipernocicepção mecânica foi calculada conforme descrito ( $\Delta_1 = T_0 - T_1$ ;  $\Delta_3 = T_0 - T_3$  e  $\Delta_5 = T_0 - T_5$ ) e expressa como limiar de retirada em gramas.

#### *4.2.2.1. Avaliação do efeito de *Mo*-CBP<sub>4</sub> sobre a migração de neutrófilos na hipernocicepção mecânica induzida por carragenina*

*Mo*-CBP<sub>4</sub> (40 mg/kg) ou salina foram administradas oralmente em camundongos. Depois de 1 hora, foi administrada carragenina na região intra-plantar da pata traseira (300  $\mu$ g/pata). Três horas após o estímulo (pico de atividade da carragenina), os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o tecido subcutâneo plantar das patas foi coletado e armazenado a -70 °C, para posterior quantificação da atividade de mieloperoxidase (MPO), como descrito anteriormente por Cunha e colaboradores (2008).

No momento da dosagem, as amostras de tecido foram descongeladas e incubadas em solução de brometo de hexadeciltrimetilamonio 0,5% (HTAB), na proporção de 50 mg de tecido por mL, homogeneizados e centrifugados (1500 x *g*, por 15 minutos, a 4 °C). O sobrenadante obtido foi transferido para um eppendorf e submetido ao choque térmico em três etapas de congelamento e descongelamento (-20 °C; 10 minutos cada). O sobrenadante foi novamente homogeneizado e centrifugado (1500 x *g*; 15 minutos, a 4 °C), para melhor remoção de contaminantes.

Em seguida, as amostras foram plaqueadas (duplicatas de 7  $\mu$ L em placas de 96 poços) e adicionados 200  $\mu$ L da solução de leitura (5 mg de O-dianisidina; 15  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%; 3 mL de tampão fosfato; 27 mL de H<sub>2</sub>O). A leitura da absorbância foi obtida a 460 nm ( $t_0=0$  min e  $t_1=1$  min) em leitor de microplacas. A mudança na absorbância foi plotada em uma curva padrão de neutrófilos, expressa como neutrófilos/mg de tecido e interpretada como atividade da enzima mieloperoxidase.

#### **4.2.3. Avaliação do efeito de Mo-CBP<sub>4</sub> sobre a hipernocicepção mecânica induzida por prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e epinefrina**

Camundongos foram tratados com Mo-CBP<sub>4</sub> (40 mg/kg) ou salina via oral e após 1 hora PGE<sub>2</sub> ou epinefrina (100 ng/pata) foi administrada via i.pl., na pata traseira. A hipernocicepção mecânica foi avaliada 3 e 2 horas após a administração de PGE<sub>2</sub> e epinefrina, respectivamente. O grupo controle negativo foi formado por animais tratados com salina via oral. A intensidade de hipernocicepção mecânica foi calculada conforme descrito ( $\Delta = T_0 - T_F$ ) e expressa como limiar de retirada em gramas.

#### **4.2.4. Avaliação do efeito de Mo-CBP<sub>4</sub> sobre a atividade motora de animais submetidos ao campo aberto**

O teste foi realizado utilizando a metodologia descrita anteriormente por Archer (1973). Os animais ( $n = 5$ ) foram tratados com Mo-CBP<sub>4</sub> (40 mg/kg) ou salina via oral e, após 1 hora, colocados individualmente em caixas de acrílico (30 x 30 x 15 cm), com a parte inferior dividida em 9 quadrantes. Após a ambientação de 1 minuto, o número de quadrantes cruzados foi contado por um período de 4 minutos. Foi considerado um quadrado cruzado aquele em que o animal permaneceu com as 4 patas repousadas sobre este. Um grupo de animais foi tratado com diazepam (5 mg/kg; i.p.) e, 30 minutos depois, foi submetido ao teste, correspondendo ao controle positivo. Os resultados foram expressos como número de quadrados cruzados  $\pm$  desvio padrão.

### **4.3. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Para verificação das diferenças estatísticas entre os grupos, foi realizada Análise de Variância (ANOVA) e teste de Bonferroni. Para todas as análises, o resultado foi considerado significativo quando  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

---

### 5.1. Atividade anti-inflamatória de *Mo-CBP<sub>4</sub>*

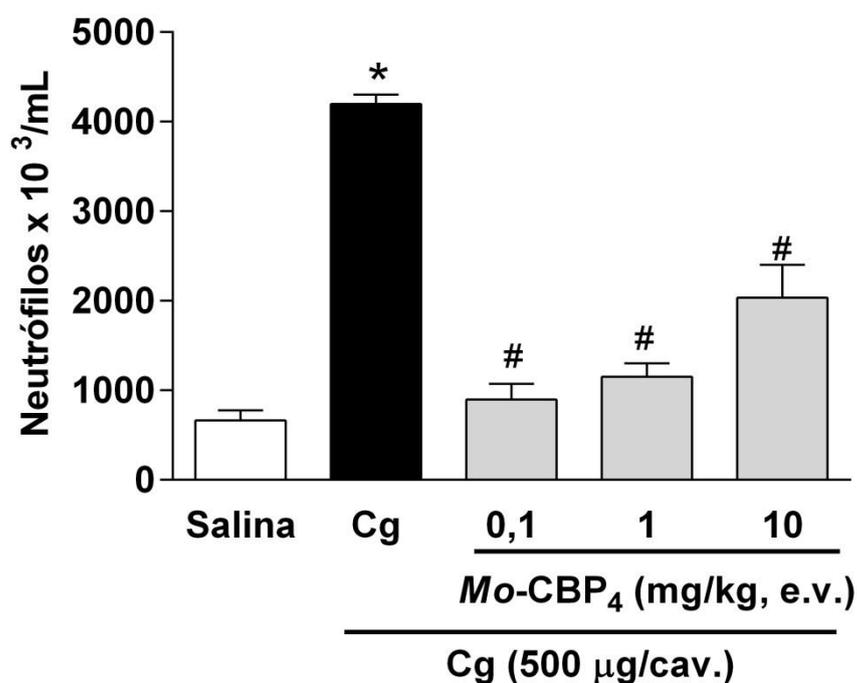
#### 5.1.1. Avaliação do efeito de *Mo-CBP<sub>4</sub>*, via endovenosa, sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina

Carragenina induziu de forma significativa ( $p < 0,05$ ) a migração de neutrófilos ( $4200 \pm 180,3$  neutrófilos  $\times 10^3/\text{mL}$ ) para a cavidade peritoneal (FIGURA 1) em ratos. O pré-tratamento com *Mo-CBP<sub>4</sub>* foi capaz de reduzir a migração de neutrófilos induzida pela administração intraperitoneal de carragenina, porém tal atividade não se mostrou dose-dependente. Para as doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg houve migração de  $900 \pm 180,3$ ,  $1150 \pm 300,0$  e  $2033 \pm 637,1$  neutrófilos  $\times 10^3/\text{mL}$  de fluido, respectivamente. Apesar de uma tendência a reduzir o efeito observado, quando aumentada a dose de *Mo-CBP<sub>4</sub>*, a análise estatística não mostrou diferença entre as doses testadas. Na menor dose (0,1 mg/kg), foi observado que o número de neutrófilos equiparou-se ao do grupo controle salina, com uma inibição de 79% da migração induzida pelo agente inflamatório.

#### 5.1.2. Avaliação do efeito de *Mo-CBP<sub>4</sub>*, via oral, sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por zymosan

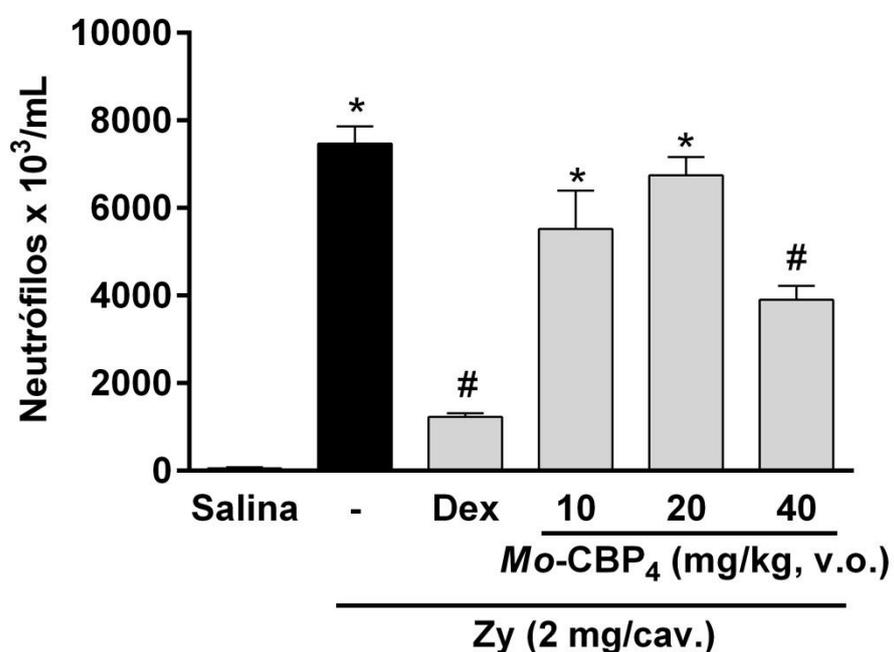
A atividade via oral de *Mo-CBP<sub>4</sub>* foi avaliada usando o modelo de peritonite induzida por zymosan em camundongos. A administração de zymosan induziu de forma significativa ( $p < 0,05$ ) a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal ( $7471,7 \pm 782,1$  neutrófilos  $\times 10^3/\text{mL}$ ). A migração de neutrófilos para cavidade peritoneal em animais que receberam previamente *Mo-CBP<sub>4</sub>* nas doses de 10, 20 e 40 mg/kg, foram quantificados  $5524,5 \pm 1735,2$ ,  $6742,5 \pm 935,2$  e  $3902,8 \pm 192,58$  neutrófilos  $\times 10^3/\text{mL}$  de fluido, respectivamente (FIGURA 2). Apenas a dose de 40 mg/kg mostrou efeito significativo, com uma inibição de 48%, tendo sido escolhida para dar continuidade aos estudos em relação à atividade anti-inflamatória de *Mo-CBP<sub>4</sub>*. Dexametasona (Dex), um corticóide usado como droga de referência, foi capaz de inibir em 84% a migração de neutrófilos.

Figura 1. *Mo*-CBP<sub>4</sub> (e.v.) reduz a migração de neutrófilos induzida por carragenina em ratos



Ratos ( $n = 6$ ) foram tratados com *Mo*-CBP<sub>4</sub> (0,1, 1 e 10 mg/kg), via e.v., 30 minutos antes do agente inflamatório, carragenina. Migração neutrofílica foi avaliada 4 horas depois. As colunas verticais representam a média  $\pm$  desvio padrão. \*Diferente em relação à salina; #Diferente em relação à carragenina ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Bonferroni.

Figura 2. *Mo*-CBP<sub>4</sub> (v.o.) reduz a migração de neutrófilos induzida por zymosan em camundongos



Camundongos ( $n = 5$ ) foram tratados com *Mo*-CBP<sub>4</sub> (10, 20 e 40 mg/kg), 1 hora antes do agente inflamatório, zymosan. Dexametasona foi utilizada como controle positivo (Dex; 1 mg/kg; s.c.). Migração neutrofílica foi avaliada 4 horas depois. As colunas verticais representam a média  $\pm$  desvio padrão. \*Diferente em relação à salina (veículo); #Diferente em relação ao zymosan ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Bonferroni.

#### 5.1.2.1. Avaliação da atividade anti-inflamatória de *Mo-CBP<sub>4</sub>* após aquecimento

*Mo-CBP<sub>4</sub>*, mesmo quando submetida ao tratamento térmico (100 °C, por 1 hora), manteve sua atividade anti-inflamatória, na dose de 40 mg/kg, via oral. A inibição da migração de neutrófilos ocasionada pela proteína aquecida foi em torno de 50%, não se mostrando diferente daquela da proteína não aquecida. Zymosan induziu de forma significativa ( $p < 0,05$ ) a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal e dexametasona, usado como referência, se mostrou como anti-inflamatório (FIGURA 3).

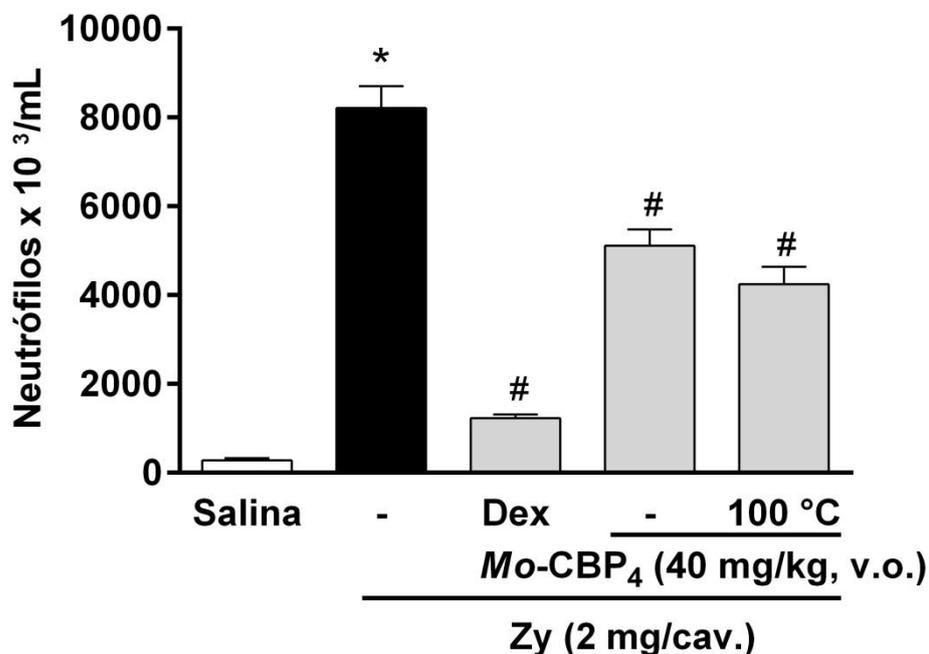
#### 5.1.2.2. Avaliação da participação do sítio de ligação ao carboidrato na atividade anti-inflamatória de *Mo-CBP<sub>4</sub>*

Para avaliar a participação do sítio lectínico de *Mo-CBP<sub>4</sub>* na atividade anti-inflamatória, a proteína foi previamente incubada com GlcNAc 0,1 M, por 1 hora. A proteína complexada com o carboidrato teve seu efeito inibido, quando administrada oralmente na dose de 40 mg/kg, enquanto que a proteína sozinha inibiu a migração de neutrófilos em 40%. GlcNAc 0,1 M não foi capaz de causar redução significativa ( $p > 0,05$ ) na migração de neutrófilos (FIGURA 4).

#### 5.1.2.3. Avaliação do efeito de *Mo-CBP<sub>4</sub>* sobre a liberação de citocinas pró- e anti-inflamatórias

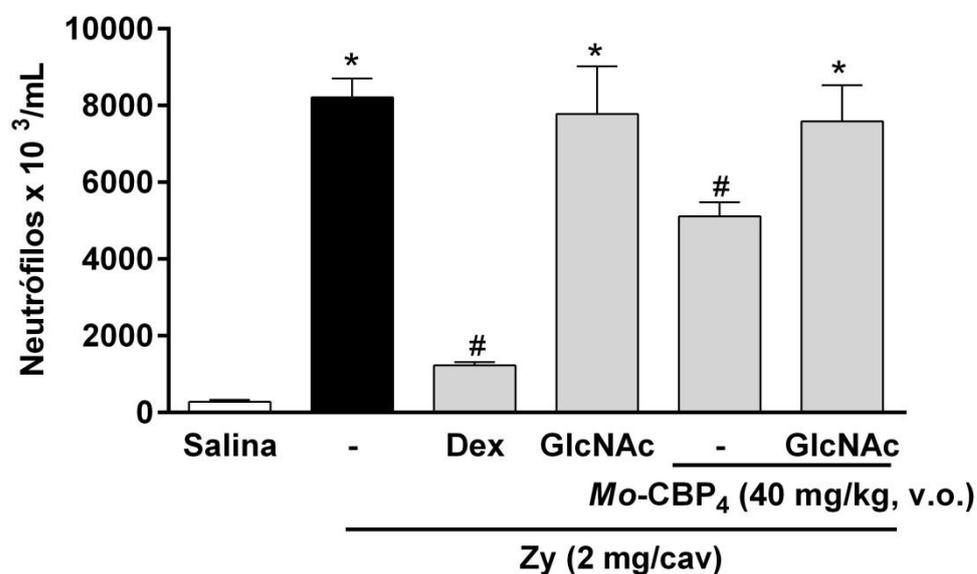
No soro dos animais tratados com *Mo-CBP<sub>4</sub>*, foi verificada diminuição do nível de IL-1 $\beta$ , em torno de 23%, quando comparada com a produção induzida por zymosan (FIGURA 5A). Já para TNF- $\alpha$ , não houve interferência por parte do pré-tratamento com a proteína (FIGURA 5B). Por outro lado, IL-10, uma citocina anti-inflamatória, teve sua produção sistêmica aumentada nos animais que receberam *Mo-CBP<sub>4</sub>*, antes da administração do indutor inflamatório, em comparação ao grupo controle (FIGURA 5C). Para as dosagens no fluido peritoneal, não foi encontrada interferência nos níveis de citocinas, quando considerado o pré-tratamento com *Mo-CBP<sub>4</sub>* (FIGURA 6).

Figura 3. *Mo*-CBP<sub>4</sub> mantém a atividade anti-inflamatória, mesmo após tratamento térmico a 100 °C, por 1 hora



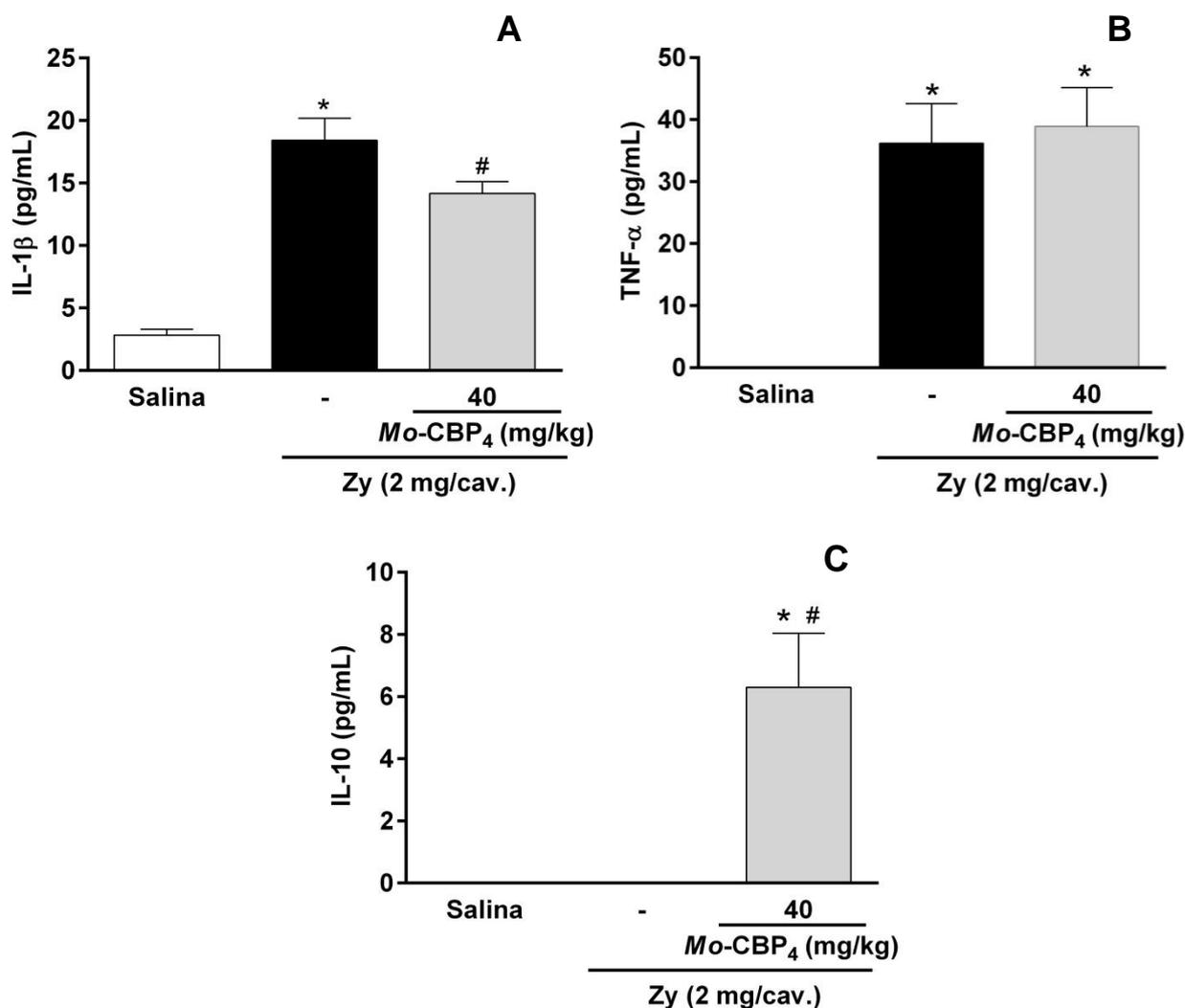
Camundongos (n = 5) foram tratados com *Mo*-CBP<sub>4</sub> (40 mg/kg), aquecida (100 °C, por 1 h) ou não, 1 hora antes da injeção de zymosan. Dexametasona foi utilizada como controle positivo (Dex; 1 mg/kg; s.c.). Migração neutrofílica foi avaliada 4 horas depois. As colunas verticais representam a média ± desvio padrão. \*Diferente em relação à salina (veículo); #Diferente em relação ao zymosan ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Bonferroni.

Figura 4. *Mo*-CBP<sub>4</sub> associada ao açúcar específico, *N*-acertil-D-glucosamina 0,1 M, não possui efeito inibitório sobre a migração de neutrófilos induzida por zymosan em camundongos



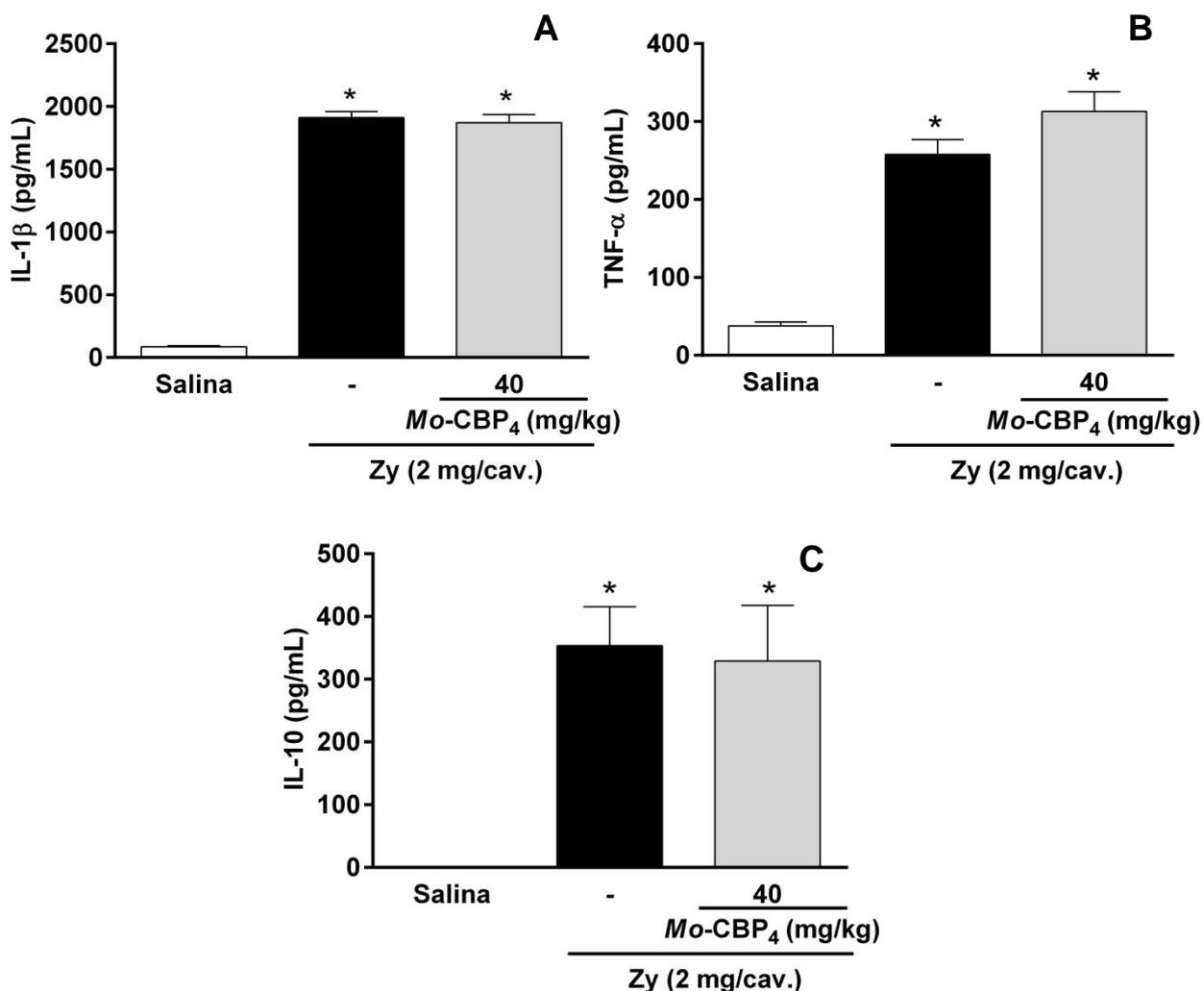
Camundongos ( $n = 5$ ) foram tratados com *Mo*-CBP<sub>4</sub> na dose de 40 mg via oral, incubada ou não com GlcNAc (0,1 M), 1 h antes da injeção de zymosan. Dexametasona foi utilizada como controle positivo (Dex; 1 mg/kg; s.c.). Migração neutrofílica foi avaliada 4 horas depois. As colunas verticais representam a média  $\pm$  desvio padrão. \*Diferente em relação à salina (veículo); #Diferente em relação ao zymosan ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Bonferroni.

Figura 5. *Mo*-CBP<sub>4</sub> altera os níveis de IL-1 $\beta$  e IL-10, mas não de TNF- $\alpha$ , no soro de camundongos, em modelo de peritonite induzida por zymosan



Camundongos ( $n = 5$ ) foram tratados com *Mo*-CBP<sub>4</sub> (40 mg/kg; v.o.) ou salina, 1 hora antes do estímulo (Zy; 2 mg/cav; i.p.). As dosagens de IL-1 $\beta$  (A), TNF- $\alpha$  (B) e IL-10 (C) foram feitas no soro obtido 4 horas após a injeção de zymosan. As barras representam média  $\pm$  desvio padrão. \*.#Indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo salina e zymosan, respectivamente (ANOVA, teste de Bonferroni).

Figura 6. *Mo-CBP<sub>4</sub>* não altera os níveis de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 no fluido peritoneal de camundongos, em modelo de peritonite induzida por zymosan



Camundongos (n = 5) foram tratados com *Mo-CBP<sub>4</sub>* (40 mg/kg; v.o.) ou salina, 1 hora antes do estímulo (Zy; 2 mg/cav; i.p.). As dosagens de IL-1 $\beta$  (A), TNF- $\alpha$  (B) e IL-10 (C) foram feitas do fluido peritoneal obtido 4 horas após a injeção de zymosan. As barras representam média  $\pm$  E.P.M.. \*Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo salina (veículo) (ANOVA, teste de Bonferroni).

## **5.2. Atividade antinociceptiva de *Mo-CBP<sub>4</sub>***

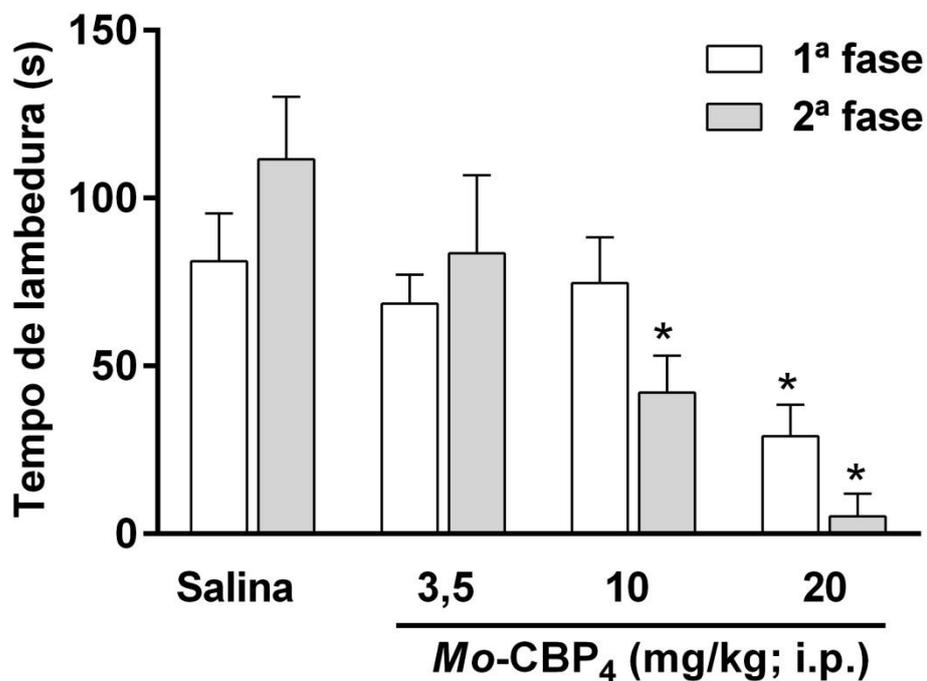
### ***5.2.1. Avaliação do efeito de *Mo-CBP<sub>4</sub>* sobre a nocicepção induzida por formalina***

*Mo-CBP<sub>4</sub>*, ao ser administrada intraperitonealmente 30 minutos antes da injeção do agente nociceptivo, foi capaz de diminuir o tempo de lambertura da pata em 62%, na dose de 10 mg/kg, na fase inflamatória da dor (2ª fase), chegando a abolir quase que totalmente (95% de inibição) na dose de 20 mg/kg. Porém, na fase neurogênica da dor, *Mo-CBP<sub>4</sub>* só apresentou atividade antinociceptiva na dose de 20 mg/kg, diminuindo em torno de 64% o tempo de lambertura da pata induzida por formalina (FIGURA 7).

### ***5.2.2. Avaliação do efeito de *Mo-CBP<sub>4</sub>* sobre a hipernocicepção mecânica induzida por carragenina***

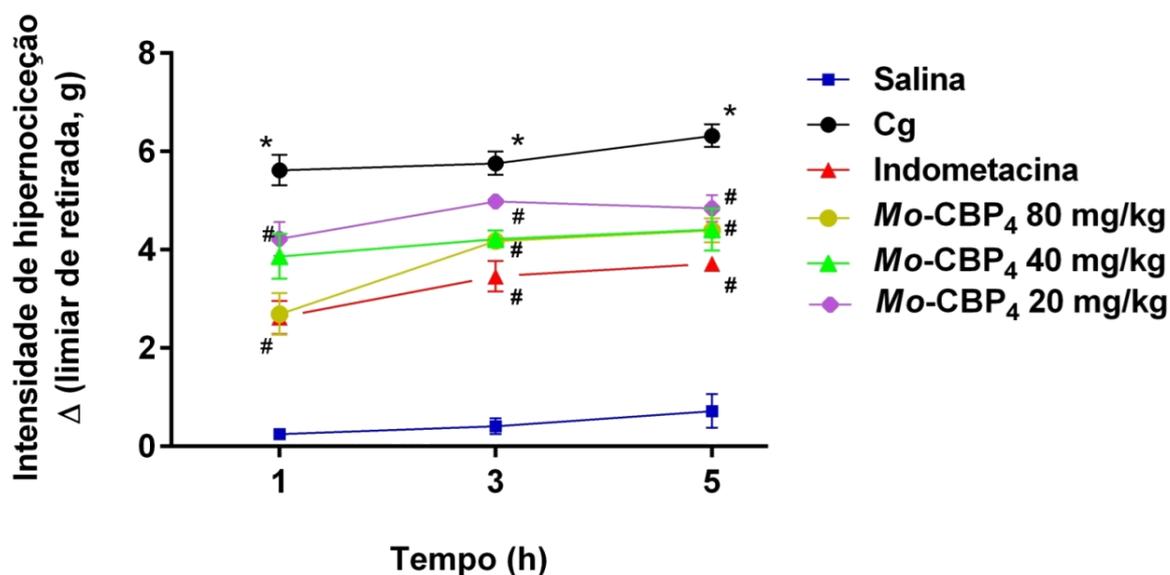
Animais sensibilizados previamente com carragenina, e após 1, 3 e 5 horas submetidos ao teste do von Frey eletrônico, mostraram aumento na intensidade de hipernocicepção mecânica em relação ao grupo que recebeu salina (controle). *Mo-CBP<sub>4</sub>*, quando administrada na dose de 40 mg/kg, via oral, 1 hora antes da sensibilização, apresentou atividade anti-hipernociceptiva, diminuindo em 31%, 18% e 30% a intensidade de hipernocicepção causada após 1, 3 e 5 horas da administração de carragenina, respectivamente. Na dose de 80 mg/kg da proteína, estas inibições foram de 52%, 27% e 30%, respectivamente. *Mo-CBP<sub>4</sub>*, nas duas doses (40 e 80 mg/kg) e nos três tempos testados, não apresentou diferença significativa em sua atividade quando comparada à indometacina, um anti-inflamatório não esteroideal utilizado como droga de referência para este tipo de teste (FIGURA 8).

Figura 7. *Mo*-CBP<sub>4</sub> (i.p.) reduz o tempo de lambertura da pata de camundongos induzida por formalina 2,5%



Camundongos ( $n = 5$ ) foram tratados com *Mo*-CBP<sub>4</sub> (3,5, 10 e 20 mg/kg), intraperitonealmente, 30 minutos antes da injeção intra-plantar de 20  $\mu$ L de formalina 2,5%. As colunas verticais representam a média  $\pm$  desvio padrão. \*Diferente ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle de cada fase, pelo teste de Bonferroni.

Figura 8. *Mo*-CBP<sub>4</sub> reduz hipernociceção inflamatória aguda em camundongos induzida por carragenina



Camundongos ( $n = 5$ ) foram tratados com *Mo*-CBP<sub>4</sub> (20, 40 ou 80 mg/kg; v.o.) ou indometacina (5 mg/kg; i.p.), 1 hora ou 30 minutos antes da injeção de carragenina (300  $\mu$ g/pata), respectivamente. Após 1, 3 e 5 horas da administração do estímulo inflamatório, os animais foram desafiados no von Frey eletrônico. Resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \*Diferente em relação à salina; #Diferente em relação à carragenina ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Bonferroni.

#### ***5.2.2.1. Avaliação do efeito de Mo-CBP<sub>4</sub> sobre a migração de neutrófilos na hipernocicepção mecânica induzida por carragenina***

A migração de neutrófilos na pata dos animais, após o estímulo inflamatório, foi estimada, dosando a atividade mieloperoxidásica no tecido proveniente da pata sensibilizada. Carragenina (300 µg/pata), quando aplicada na pata do animal, provocou acúmulo de neutrófilos em comparação ao grupo salina. Mo-CBP<sub>4</sub>, quando administrada oralmente, 1 hora antes da sensibilização da pata, na dose de 40 mg/kg, foi capaz de prevenir a migração de neutrófilos, com uma inibição em torno de 96% em relação ao grupo carragenina (FIGURA 9)

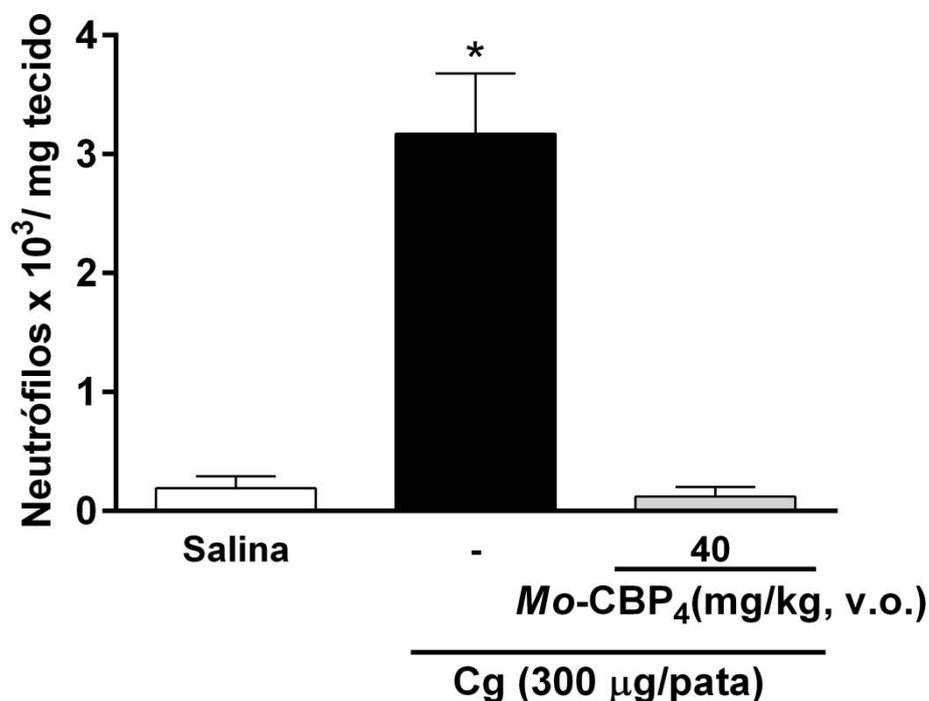
#### ***5.2.3. Avaliação do efeito de Mo-CBP<sub>4</sub> sobre a hipernocicepção mecânica induzida por prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e epinefrina***

PGE<sub>2</sub> e epinefrina são dois mediadores que sensibilizam diretamente nociceptores e ao serem administrados por via i.pl. na pata dos animais foram capazes de aumentar a intensidade de hipernocicepção mecânica, avaliada pelo teste do von Frey eletrônico. O pré-tratamento oral com Mo-CBP<sub>4</sub> (40 mg/kg) não interferiu na sensibilização destes mediadores (FIGURA 10).

#### ***5.2.4. Avaliação do efeito de Mo-CBP<sub>4</sub> sobre a atividade motora de animais submetidos ao campo aberto***

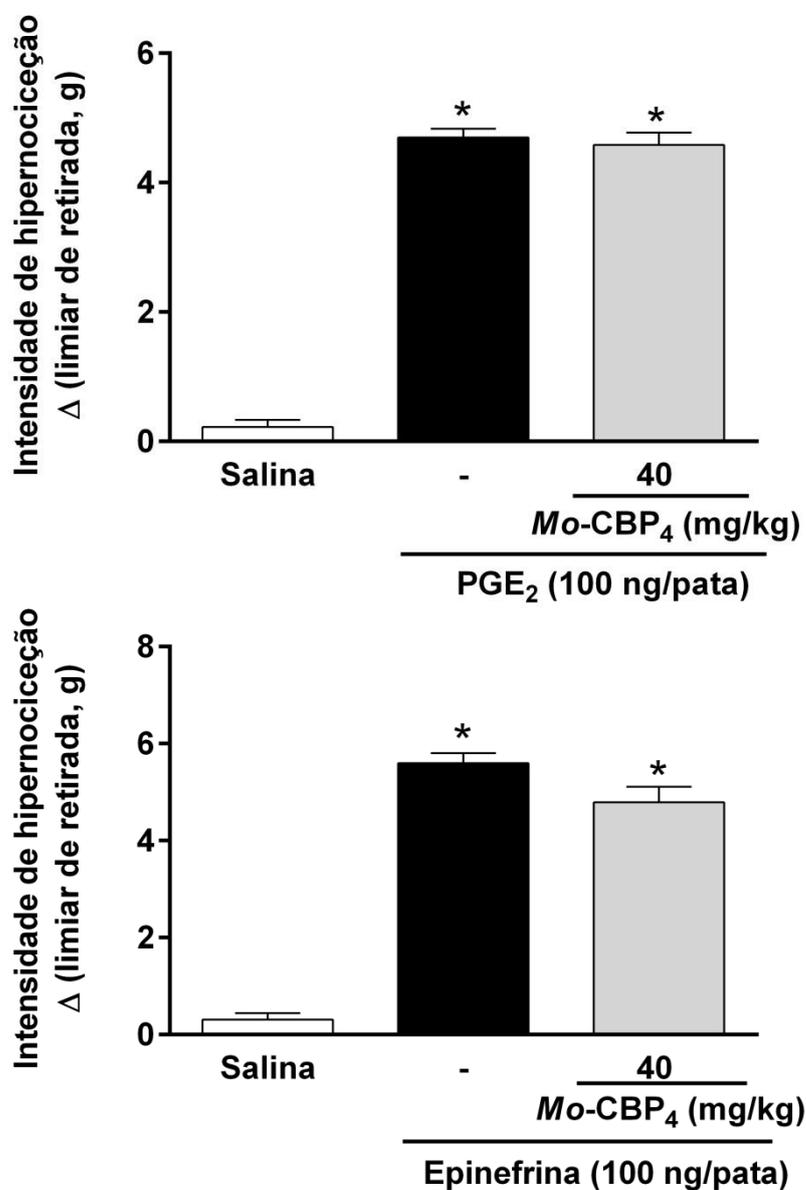
Mo-CBP<sub>4</sub> (40 mg/kg) não interferiu na atividade motora dos animais, quando administrada oralmente, já que o número de quadrados cruzados, no tempo de 4 minutos no campo aberto, equiparou-se ao do grupo salina. Diazepam, um ansiolítico utilizado como droga de referência para este teste, foi capaz de diminuir em torno de 79% o número de quadrados cruzados em relação ao grupo salina (FIGURA 11).

Figura 9. *Mo*-CBP<sub>4</sub> inibe a migração de neutrófilos induzida por carragenina na pata de camundongos



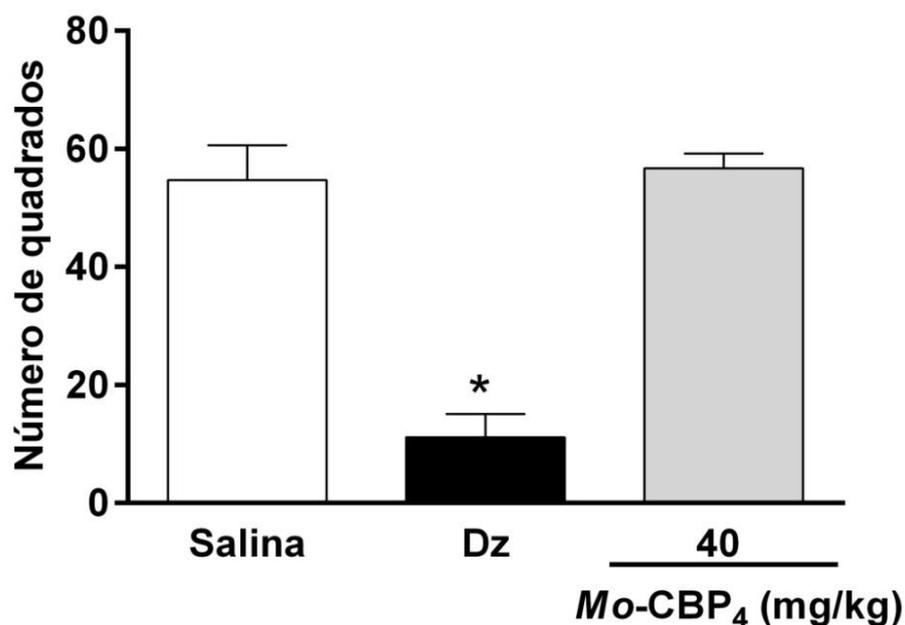
Camundongos (n = 5) foram tratados com *Mo*-CBP<sub>4</sub> (40 mg/kg) ou salina, via oral, 1 hora antes da injeção de Cg (300 µg/pata). Após 3 horas da administração do estímulo inflamatório, os camundongos foram sacrificados e o tecido subplantar foi retirado para quantificação de mieloperoxidase. Resultados são expressos como média ± E.P.M. \*Indica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) comparado com o grupo salina (ANOVA, teste de Bonferroni).

Figura 10. *Mo*-CBP<sub>4</sub> não reduz a hipernociceção inflamatória aguda induzida por PGE<sub>2</sub> ou epinefrina



Camundongos foram tratados com *Mo*-CBP<sub>4</sub> (40 mg/kg; v.o.) ou salina 1 hora antes da injeção de PGE<sub>2</sub> ou epinefrina (100 µg/pata). Após 3 horas ou 1 hora da administração de PGE<sub>2</sub> e epinefrina, respectivamente, os animais foram desafiados no von Frey eletrônico. Resultados são expressos como média ± desvio padrão. \*Diferente em relação à salina ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Bonferroni.

Figura 11. *Mo*-CBP<sub>4</sub> não afeta a atividade locomotora de camundongos submetidos ao campo aberto



Os animais foram tratados com *Mo*-CBP<sub>4</sub> (40 mg/kg; v.o.) ou salina. Uma hora depois, os animais foram submetidos ao campo aberto e os quadrados cruzados foram contados por 4 minutos, deixando-os anteriormente por 1 minuto para adaptação. Diazepam (Dz 5 mg/kg; i.p.) foi usado como controle positivo. Resultados são expressos como média  $\pm$  desvio. \*Diferente em relação ao tratamento com salina ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Bonferroni.

## 6. DISCUSSÃO

---

O presente capítulo objetivou o estudo mais aprofundado das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva de *Mo*-CBP<sub>4</sub>, utilizando modelos específicos e que possibilitem fornecer pistas sobre o mecanismo de ação farmacológica dessa proteína.

Na primeira parte, foram abordados estudos para analisar a atividade anti-inflamatória de *Mo*-CBP<sub>4</sub>. O modelo inicialmente utilizado foi o de peritonite induzida por carragenina em ratos. Carragenina é um polissacarídeo sulfatado que, quando injetado na cavidade peritoneal de ratos, provoca reação inflamatória aguda, iniciando através do reconhecimento desta molécula por parte das células residentes, principalmente macrófagos. Estas células são, então, ativadas a secretar mediadores inflamatórios, como citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), quimiocinas, produtos do ácido araquidônico e óxido nítrico, que induzem o recrutamento de leucócitos circulantes para o sítio da inflamação. Nesta inflamação, de caráter agudo, os leucócitos mais abundantes são os neutrófilos (SOUZA *et al.*, 1988).

Os resultados obtidos mostram que *Mo*-CBP<sub>4</sub>, quando administrada endovenosamente, inibiu a migração de neutrófilos causada por carragenina já na menor dose (0,1 mg/kg). Todavia, esse efeito não ocorreu de maneira dose-dependente, já que não houve redução do recrutamento de neutrófilos ao aumentar a quantidade de proteína administrada.

Atividade anti-inflamatória via endovenosa já foi relatada para outras lectinas de plantas, porém nenhuma demonstrou, utilizando a mesma metodologia, uma atividade tão potente (em torno de 79%) em uma dose baixa (0,1 mg/kg), quanto a de *Mo*-CBP<sub>4</sub>. Hemaglutinina de *Hypnea cervicornis*, que tem afinidade por mucina, no mesmo modelo de peritonite induzida por carragenina, inibiu em 38% a migração de neutrófilos na dose de 0,1 mg/kg (BITENCOURT *et al.*, 2008). As lectinas de *Canavalia grandiflora* e *Parkia biglobosa*, ambas manose/glucose específicas, também diminuíram o recrutamento de neutrófilos induzido por carragenina na dose de 1 mg/kg (NUNES *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2013). A lectina galactose específica isolada de sementes de *Luetzelburgia auriculata* apresentou atividade anti-inflamatória quando administrada endovenosamente na dose de 2 mg/kg (ALENCAR *et al.*, 2010). Já a lectina de *Lonchocarpus sericeus*, que tem como açúcar ligante

específico N-acetil-D-glucosamina, só foi capaz de reduzir a migração de neutrófilos induzida por carragenina na dose de 3 mg/kg (NAPIMONGA *et al.*, 2007).

Em estudos anteriores foi demonstrado também que *Mo*-CBP<sub>4</sub>, via oral, na dose de 10 mg/kg, foi capaz de inibir em 52% as contorções abdominais induzidas por ácido acético. Esta atividade é bastante promissora já que a maioria dos fármacos utilizados é administrada por via oral e deglutidos. Assim, outra abordagem foi realizada com o intuito de investigar o potencial anti-inflamatório desta proteína, quando administrada oralmente em modelo inflamatório mais específico.

O modelo experimental escolhido foi o da peritonite induzida por zymosan, pois este modelo é utilizado em camundongos, o que possibilitou um estudo mais aprofundado com uma quantidade reduzida de proteína. Zymosan é uma substância derivada da parede celular da levedura *Sacharomyces cerevisiae*, contendo uma mistura de polissacarídeo, proteína e lipídeo que, quando injetado na cavidade peritoneal de camundongos, desencadeia um processo inflamatório agudo, com o aumento da permeabilidade vascular e migração de neutrófilos. Assim como a carragenina, sua ação é dependente de células residentes, como macrófagos, que depois de ativados, liberam mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas, produtos do ácido araquidônico e óxido nítrico (DOHERTY, 1985).

Foram utilizadas três doses crescentes de *Mo*-CBP<sub>4</sub> (10, 20 e 40 mg/kg), começando com a dose que apresentou efeito sobre as contorções induzidas por ácido acético. Os resultados mostram que somente na dose de 40 mg/kg a lectina apresentou atividade anti-inflamatória, inibindo cerca de 48% a migração de neutrófilos induzida por zymosan.

A habilidade de *Mo*-CBP<sub>4</sub> exercer uma ação farmacológica via oral é um fato a ser frisado no presente estudo. Sabe-se que uma substância quando passa pelo trato gastrointestinal está sujeita a diversos fatores, capazes de provocar sua inativação, como a digestão mecânica, a digestão enzimática e os extremos de pH. De fato, a proteína aqui estudada parece ser bastante resistente a essas barreiras. Estudos anteriores, utilizando o modelo de digestibilidade *in vitro*, mostraram que *Mo*-CBP<sub>4</sub> foi resistente à ação de proteases de animais monogástricos, como pepsina, tripsina e quimotripsina, tanto quando a proteína foi incubada com tais enzimas individualmente, como em sequência, simulando a passagem da proteína pelo trato gastrointestinal (PEREIRA *et al.*, 2011). Em adição, análises de estabilidade através da técnica de dicróismo circular, descritas neste trabalho (Capítulo 2), mostraram,

também, que a estrutura secundária de *Mo*-CBP<sub>4</sub> praticamente não se alterou quando ela foi incubada em tampões com pHs variando de 3 a 11, reforçando a hipótese de que *Mo*-CBP<sub>4</sub>, provavelmente, atravessa o estômago e chega até o intestino de forma íntegra para ser internalizada e exercer sua ação farmacológica.

Seguindo esta tendência, a estabilidade da lectina frente à desnaturação térmica também foi estudada, aquecendo-a a 100 °C por 1 hora e depois testando sua atividade anti-inflamatória, no modelo de peritonite induzida por zymosan em camundongos. A proteína foi administrada via oral na dose de 40 mg/kg. *Mo*-CBP<sub>4</sub> aquecida manteve sua atividade, inibindo em torno de 50% a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Esse resultado corrobora com o estudo exposto no Capítulo 2, onde uma análise abordando dicroísmo circular mostrou que a proteína incubada em temperaturas de 20 a 90 °C manteve seus padrões de estrutura secundária. Adicionado a isso, sequências obtidas de peptídeos trípticos provenientes de *Mo*-CBP<sub>4</sub> continham, pelo menos, três resíduos de cisteína, passíveis de formação de pontes dissulfeto, reforçando a estrutura da proteína e dificultando a desnaturação térmica.

Sabe-se que, na medicina tradicional, a infusão de sementes de *M. oleifera* em água fervente é utilizada contra diversas enfermidades inflamatórias. Cáceres e colaboradores (1992), em um estudo etnofarmacológico, demonstraram que tal formulação popular foi eficaz em inibir o edema de pata induzido por carragenina em ratos. Diante deste fato, pode ser suposto que *Mo*-CBP<sub>4</sub> seja um dos princípios ativos desta infusão, pois se trata de uma proteína anti-inflamatória, solúvel em água e resistente a altas temperaturas.

Os dados de estabilidade de *Mo*-CBP<sub>4</sub> corroboram com resultados encontrados para outras lectinas ligantes à quitina, que são altamente resistentes a extremos de pH e proteases, tornando-se uma característica comum entre estas proteínas (BROEKAEST *et al.*, 1992; BORMANN *et al.*, 1999). Essa propriedade parece ser, também, comum às proteínas coagulantes de sementes de *M. oleifera*, como a proteína isolada por Ghebremichael e colaboradores (2005), que manteve sua atividade floculante mesmo depois de aquecida a 95 °C por 5 horas, ou a cMoL, que permaneceu ativa quando o pH do meio variou de 4,0 – 9,0, ou quando aquecida a 100 °C por 7 horas (SANTOS *et al.*, 2009). *Mo*-CBP<sub>3</sub>, outra lectina de *M. oleifera* isolada por nosso grupo de pesquisa, manteve, também, sua atividade antifúngica mesmo após aquecimento a 100 °C por 1 hora (GIFONI *et al.*, 2012).

Os neutrófilos (também conhecidos como granulócitos neutrofilicos ou leucócitos polimorfonucleares) são as células de defesa mais abundantes na circulação sanguínea do homem. Eles têm papel fundamental na defesa imune contra bactérias e fungos patogênicos e, também, participam da reação inflamatória (NATHAN, 2006). O recrutamento de neutrófilos do vaso sanguíneo para o local inflamado é dependente da ação de distintas moléculas, que atuam em sequência específica. Um inicial e essencial evento na migração de neutrófilos envolve o rolamento e a adesão de “baixa afinidade” mediada pelas selectinas (lectinas) e seus carboidratos ligantes. Três membros da família de selectinas participam desse evento: E-selectinas (expressas no endotélio), P-selectinas (expressas no endotélio e nas plaquetas) e L-selectinas (expressas nos leucócitos). A expressão dessas proteínas é regulada pela produção de citocinas em resposta ao agente inflamatório (VESTWEBER; BLANKS, 1999; LOWE, 2003). Em seguida, uma firme adesão entre os neutrófilos e o vaso é causada pelo aumento da expressão de integrinas e seus ligantes, principalmente moléculas de adesão célula-vaso 1 (VCAM-1) e moléculas de adesão intercelular 1 (ICAM-1). Com esta interação, os leucócitos param de rolar, o citoesqueleto destas células é reorganizado e, finalmente, conseguem migrar para o sítio da inflamação (COOK-MILLS; DEEM, 2005).

Apesar do papel benéfico dos neutrófilos ao hospedeiro, a ativação inapropriada destas células pode levar a danos no tecido durante uma reação inflamatória exagerada (NATHAN, 2006; NÉMETH; MÓCSAI, 2012). Assim, drogas que tenham como alvo a inibição da interação neutrófilos-endotélio, para o tratamento de doenças inflamatórias agudas, tornam-se um campo bastante promissor (PANÉS *et al.*, 1999).

É sabido que muitas lectinas exógenas têm sido descritas como moléculas capazes de interferir em processos inflamatórios, inibindo o rolamento, adesão e, conseqüentemente, a infiltração de neutrófilos em diversos modelos experimentais. Lectinas de *Araucaria angustifolia*, *Hypnea cervicornis* e *L. auriculata*, como descrito anteriormente, preveniram a migração de leucócitos, sendo este efeito dependente do sítio lectínico, uma vez que a administração concomitante com seus respectivos açúcares específicos reverteu tal fato (MOTA *et al.*, 2006; ALENCAR *et al.*, 2010; FIGUEIREDO *et al.*, 2010).

Diante desses dados, foi decidido, aqui, investigar se a interação ao carboidrato consistia em um processo essencial para a atividade anti-inflamatória de

*Mo*-CBP<sub>4</sub>. A proteína foi, então, incubada com seu açúcar específico, *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), na concentração de 0,1 M, por 1 hora, à temperatura ambiente. Tais parâmetros foram escolhidos por serem os mesmos utilizados para testar a interação da proteína com a matriz de quitina, constituindo o primeiro passo cromatográfico do processo empregado na sua purificação. *Mo*-CBP<sub>4</sub>, ligada ou não ao carboidrato, foi administrada oralmente, na dose de 40 mg/kg e, posteriormente, a peritonite foi induzida por zymosan. Os resultados mostraram que a inibição (de 40%) da migração de neutrófilos da proteína foi totalmente revertida quando ela estava complexada ao carboidrato.

Em uma explicação clássica para o mecanismo de ação anti-inflamatória de lectinas, pode-se dizer que a migração de neutrófilos está sendo inibida por *Mo*-CBP<sub>4</sub> através da competição ou bloqueio de carboidratos ligantes comuns às selectinas que, como já abordado anteriormente, são proteínas essenciais para a interação inicial dos leucócitos ao endotélio.

Os resultados apresentados também corroboram com estudos realizados por Alencar *et al.* (1999), no qual consistiram em investigar o envolvimento de três açúcares diferentes (incluindo o *N*-acetil-D-glucosamina) na migração leucocitária induzida por carragenina, utilizando três lectinas anti-inflamatórias. Nesse estudo, foi mostrado que glicoconjugados contendo *N*-acetil-D-glucosamina são essenciais para o recrutamento de neutrófilos. Assim, pode ser inferido que *Mo*-CBP<sub>4</sub> pode ser uma ferramenta específica na prevenção da migração leucocitária e, por conseguinte, da atividade anti-inflamatória. Outros estudos mais específicos devem ser realizados a fim de esclarecer este efeito inibitório de *N*-acetil-D-glucosamina.

Outra abordagem utilizada para estudar o mecanismo de ação de *Mo*-CBP<sub>4</sub> foi avaliar o efeito que esta proteína tem sobre a liberação de citocinas pró- e anti-inflamatórias, após ensaio de peritonite induzida por zymosan. Durante a fase aguda do processo inflamatório, as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  são secretadas por células residentes ativadas por estímulos imunes e não imunes (DINARELLO, 2000). Tais mediadores quando injetados em diferentes modelos animais induzem a migração de neutrófilos (BOMBINI *et al.*, 2004). Em contrapartida, a neutralização destas moléculas ou seus receptores reduz a migração de leucócitos induzida por diferentes estímulos inflamatórios (SMEETS *et al.*, 2005; FELDMANN; PUSEY, 2006). Portanto, tais citocinas são essenciais e primordiais para o processo inflamatório.

Os resultados apresentados mostram que *Mo-CBP<sub>4</sub>* não foi capaz de interferir na liberação dessas citocinas pró-inflamatórias no local da inflamação (dosagem do fluido peritoneal), porém, redução foi detectada no nível de IL-1 $\beta$  dosada do soro dos animais.

Outras lectinas também influenciaram na liberação de IL-1 $\beta$  em modelos de inflamação aguda. A aglutinina de *C. grandiflora* em peritonite induzida por zymosan reduziu os níveis desta citocina no fluido peritoneal (NUNES *et al.*, 2009). A lectina de *L. sericeus*, que tem como açúcar específico *N*-acetil-D-glucosamina, inibiu a migração de neutrófilos induzida por carragenina, além de reduzir os níveis de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  em modelo de peritonite e edema de pata (NAPIMOGA *et al.*, 2007).

*Mo-CBP<sub>4</sub>* também mostrou afetar os níveis de IL-10 no soro dos animais submetidos à peritonite induzida por zymosan. IL-10 é a mais importante citocina anti-inflamatória da resposta imune. Ela desativa a síntese de citocinas pró-inflamatórias por monócitos/macrófagos, inibindo NF- $\kappa$ B e promovendo a degradação de RNA mensageiro de mediadores pró-inflamatórios (OPAL; DEPALO, 2000). Estudos utilizando a lectina do látex de *Synadenium carcatum* mostraram que a administração oral desta proteína foi capaz de inibir o extravasamento de neutrófilos e eosinófilos em inflamação aguda e crônica e de aumentar os níveis de IL-10 no sangue de animais submetidos a um modelo de asma inflamatória. A lectina de *Viscum album* também induziu a produção de IL-10 em células mononucleares do sangue periférico de animais em modelos imunomodulatórios, sugerindo que outras lectinas de plantas com ação terapêutica podem agir similarmente a estas duas aglutininas (HOSTANSKA *et al.*, 1995; ROGERO *et al.*, 2007).

É sabido que existe uma relação próxima entre a inflamação e dor, já evidenciada em diversos estudos. Como dito anteriormente, *Mo-CBP<sub>4</sub>* apresentou atividade antinociceptiva, quando administrada por via oral na dose de 10 mg/kg, inibindo as contorções induzidas por ácido acético em camundongos. Porém, o modelo utilizado é inespecífico quanto à origem da dor que está sendo inibida. Portanto, a segunda parte do presente capítulo consistiu em aprofundar os estudos sobre a atividade analgésica de *Mo-CBP<sub>4</sub>*.

A primeira abordagem realizada foi o teste da formalina, que é um dos modelos mais válidos para avaliar a dor clínica (AMARAL *et al.*, 2007). Esse teste consiste em injetar uma solução de formaldeído 2,5% na região intraplantar da pata dos animais, provocando um estímulo nociceptivo, que é visualizado através da

lambedura da mesma. Este teste envolve uma nocicepção aguda tônica moderada caracterizada por duas fases distintas. A primeira fase é causada predominantemente pela ativação dos nociceptores das fibras sensoriais, principalmente as do tipo C. Já a segunda fase é caracterizada como uma dor de origem inflamatória, desencadeada por uma combinação de estímulos inflamatórios, além de mecanismos de sensibilização espinhal e central (TJOLSEN *et al.*, 1992; TJOLSEN; HOLE, 1997). Resultados experimentais têm indicado que a substância P e bradicinina participam da fase neurogênica, podendo ser suprimida principalmente por drogas analgésicas de ação central (opioides, como morfina). Na segunda fase, alguns mediadores como histamina, serotonina, bradicinina, aminoácidos e prostaglandinas podem estar envolvidos na dor inflamatória, a qual é muito sensível à ação da maioria dos anti-inflamatórios não esteroidais, incluindo o ácido acetil salicílico, indometacina e naproxeno (DAI *et al.*, 2002).

Os resultados obtidos para *Mo-CBP<sub>4</sub>* mostram uma tendência da analgesia estar relacionada à atividade anti-inflamatória, desde que na dose de 10 mg/kg (a mesma utilizada no teste de contorções induzidas por ácido acético) só foi observada diminuição do tempo de lambedura da pata na segunda fase, sendo esta inibição de 62%. A lectina de *Caulerpa cupressoides* mostrou o mesmo perfil antinociceptivo de *Mo-CBP<sub>4</sub>*, desde que reduziu apenas a fase inflamatória da nocicepção causada pela injeção da formalina. Além disso, essa lectina não apresentou atividade analgésica no teste da placa quente, utilizado para avaliar a atividade central via receptores supra-espinhal e espinhal (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Em contrapartida, a lectina de sementes de *C. brasiliensis* reduziu ambas as fases do teste da formalina, além de aumentar o tempo de latência no teste da placa quente, evidenciando uma ação central via receptores opioides (PIRES *et al.*, 2010). Portanto, havendo fortes evidências de que a atividade antinociceptiva de *Mo-CBP<sub>4</sub>* estava envolvida com sua atividade anti-inflamatória, e que tais ações foram obtidas também quando a proteína foi administrada oralmente, o próximo passo foi investigar o seu potencial analgésico, via oral, utilizando um modelo mais específico de dor inflamatória.

Vários protocolos podem ser utilizados para o estudo do efeito de substâncias sobre a hipernocicepção ou nocicepção inflamatória. Tais testes podem ser de dois tipos principais: os que avaliam a ação de drogas que causam a estimulação de vias nociceptoras, transformando em um comportamento indicativo de dor manifesta, como é o caso do teste da formalina ou contorções abdominais

induzidas por ácido acético; e os que avaliam o poder sobre o efeito de drogas que, através da sensibilização das fibras neuronais, diminuem o limiar de tolerância a um estímulo (seja ele mecânico, térmico ou químico), indicando a presença de fenômenos como hipernocicepção ou alodinia (LUZ, 2012).

O teste de pressão crescente ou von Frey eletrônico é um modelo de hipernocicepção inflamatória mecânica, que consiste na prévia sensibilização da pata dos animais utilizando estímulos inflamatórios com ação indireta (carragenina) ou direta (PGE<sub>2</sub> e aminas simpáticas) e na avaliação desta sensibilização por meio da resposta do animal a uma pressão exercida por um anestesiómetro eletrônico. Esta técnica permite a quantificação de analgesia periférica de drogas com diferentes mecanismos de ação (CUNHA *et al.*, 2004). Assim, inicialmente, a atividade anti-hipernociceptiva de *Mo-CBP<sub>4</sub>* foi avaliada utilizando os testes de von Frey. A carragenina induz a sensibilização inflamatória através de uma cascata de citocinas liberadas por células residentes ou células migrantes iniciada pela produção de bradicinina (FERREIRA; LORENZETTI; POOLE, 1993). TNF- $\alpha$  é a primeira citocina a ser liberada, que provoca a liberação de IL-6/IL-1 $\beta$  e CINC-1, responsáveis pela estimulação da síntese de prostaglandinas e liberação de aminas simpatomiméticas, respectivamente (VERRI *et al.*, 2006). Estes últimos mediadores são responsáveis pela sensibilização direta dos nociceptores (CUNHA *et al.*, 2005).

Os resultados mostram que o tratamento via oral de *Mo-CBP<sub>4</sub>* foi capaz de inibir a sensibilização causada por carragenina nos três tempos testados, nas duas maiores doses (40 e 80 mg/kg), não havendo diferenças entre elas. A potência anti-hipernociceptiva da lectina foi equiparada a da indometacina, um anti-inflamatório não-esteroidal, utilizado como droga analgésica/anti-inflamatória padrão para este teste.

Inúmeras pesquisas demonstram que na hipernocicepção mecânica, a presença e ativação de neutrófilos no foco inflamatório são essenciais para a liberação de mediadores químicos, como prostaglandinas e aminas simpáticas, que atuarão diretamente na sensibilização de nociceptores (LEVINE *et al.*, 1984; 1985; LAVICH *et al.*, 2006; CUNHA *et al.*, 2008; GERRERO *et al.*, 2008; LEMOS *et al.*, 2009; SOUTO *et al.*, 2011). Tendo esse conhecimento, foi investigado, também, se a atividade anti-hipernociceptiva de *Mo-CBP<sub>4</sub>* estaria relacionada à inibição da migração de neutrófilos, já discutida anteriormente no estudo da atividade anti-inflamatória da proteína. Para isso, foi quantificada a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), que é uma proteína estocada nos grânulos azurófilos de neutrófilos ativados e liberada

no fluido extracelular durante o processo inflamatório. Como a MPO representa cerca de 5% do peso seco total de um neutrófilo, tal dosagem fornece uma quantificação indireta destas células polimorfonucleares que migraram para o local da inflamação (SUZUKI *et al.*, 1983; LORIA *et al.*, 2008).

Os resultados mostram claramente uma redução na migração de neutrófilos nos animais pré-tratados oralmente com *Mo*-CBP<sub>4</sub>. Em relação ao grupo que recebeu apenas carragenina, a inibição chegou em torno de 96%. Este resultado corrobora com os estudos encontrados para as lectinas de *C. grandiflora* e *L. sericeus* que, utilizando o mesmo protocolo de hipernocicepção mecânica inflamatória induzida por carragenina, demonstraram relação da atividade antinociceptiva com a redução da migração de neutrófilos, utilizando dosagem de MPO. Para esta última lectina, que tem como açúcar específico *N*-acetil-D-glucosamina, a redução da MPO está relacionada à diminuição da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , no tecido inflamado (NAPIMOGA *et al.*, 2007; NUNES *et al.*, 2009). Lectina da alga *Hypnea cervicornis* também apresentou ação anti-hipernociceptiva com diminuição de MPO, porém tal atividade foi similarmente encontrada quando a sensibilização foi induzida por prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (FIGUEIREDO *et al.*, 2010).

As prostaglandinas são consideradas mediadores finais da dor inflamatória, visto que podem ativar diretamente os nociceptores, ou seja, independem da liberação de outros mediadores para promover esta sensibilização (FERREIRA *et al.*, 2009). Dessa maneira, PGE<sub>2</sub> é capaz de aumentar a permeabilidade vascular, promover vasodilatação e diminuir o limiar de disparos de potenciais de ação, facilitando a excitação neuronal, levando à hiperalgesia (CALDER, 2009; FERREIRA *et al.*, 2009). Em adição, tem sido demonstrado que, em um quadro inflamatório, além das prostaglandinas, as aminas simpáticas (noradrenalina, epinefrina e dopamina) são capazes de induzir hipernocicepção mecânica diretamente (NAKAMURA; FERREIRA, 1987; KHASAR *et al.*, 1999).

Diante dos dados apresentados, outro modelo foi abordado a fim de investigar se *Mo*-CBP<sub>4</sub> seria capaz de bloquear diretamente a sensibilização de nociceptores. Para tanto, foi realizada a indução da hipernocicepção através da injeção intraplantar de PGE<sub>2</sub> ou epinefrina, seguida de quantificação da dor mecânica no von Frey eletrônico. Os resultados mostram que a lectina não foi capaz de inibir a hipernocicepção exercida pelos mediadores mencionados, indicando que sua atividade analgésica é dependente da atividade anti-inflamatória. Este dado corrobora

com aquele encontrado para a lectina de *L. sericeus*, que compartilha com *Mo-CBP<sub>4</sub>* semelhança no açúcar ligante específico (NAPIMOGA *et al.*, 2007). É importante mencionar o fato de analgésicos que atuam inibindo a ciclo-oxigenase (anti-inflamatórios não esteroidais), produção de citocinas (talidomida) ou a migração de neutrófilos (ficuidina), assim como *Mo-CBP<sub>4</sub>*, também não apresentaram efeito sobre a hipernocicepção induzida por PGE<sub>2</sub> (RIBEIRO *et al.*, 2000; CUNHA *et al.*, 2008). Portanto, outros estudos devem ser realizados para aprofundar o mecanismo de ação antinociceptiva de *Mo-CBP<sub>4</sub>*.

Para descartar qualquer hipótese de efeito sedativo, foi avaliada a ação de *Mo-CBP<sub>4</sub>* sobre a atividade motora dos animais utilizando o teste do campo aberto. Esta metodologia é vastamente usada para investigar o comportamento de animais submetidos a sedativos (CHOLERIS *et al.*, 2001). Os resultados mostram que *Mo-CBP<sub>4</sub>*, na dose utilizada para o modelo de hiperalgesia, não afetou a atividade motora dos animais em relação ao controle salina. Já o diazepam, uma droga sedativa, diminuiu em 79% os quadrados cruzados pelos animais.

Por fim, diante dos dados aqui expostos, *Mo-CBP<sub>4</sub>* mostrou-se como uma proteína passível de utilização como ferramenta contra os processos de inflamação e dor, inclusive podendo ser utilizada pela via oral. É provável que sua atividade seja via inibição de migração neutrofílica, com efeito tanto sobre citocinas pró-inflamatória (IL-1 $\beta$ ), como anti-inflamatória (IL-10). A atividade analgésica da proteína depende da redução do processo inflamatório e não afeta a atividade locomotora dos animais. Estudos mais específicos abordando efeitos sobre mediadores inflamatórios e modulação dos mesmos devem ser realizados, bem como um estudo mais aprofundado da ação de *Mo-CBP<sub>4</sub>* sobre o rolamento de neutrófilos, a fim de ser estabelecer, por completo, o mecanismo de ação farmacológica desta lectina de sementes de *M. oleifera*.

## 7. CONCLUSÃO

---

*Mo*-CBP<sub>4</sub> mostrou potente atividade anti-inflamatória e antinociceptiva, considerando a via de administração oral. Sua ação contra o processo inflamatório foi dependente do sítio de interação ao açúcar específico, *N*-acetil-D-glucosamina e, assim como sua estrutura secundária, a potência da ação não foi alterada por altas temperaturas. Essa proteína afetou os níveis de IL-1 $\beta$  e IL-10 na circulação sanguínea dos animais, mas não os de TNF- $\alpha$ . A atividade analgésica da lectina está relacionada com inibição do processo inflamatório por parte desta proteína.



## **Capítulo 4**

**Segurança de Utilização de *Mo*-CBP<sub>4</sub>  
- Estudos Não Clínicos**

## 1. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA E JUSTIFICATIVA

---

Desde os anos 1980, proteínas têm emergido como uma importante nova classe de fármacos, com mais de 200 produtos disponíveis no mercado. Essas macromoléculas atuam de maneira dinâmica e diversificada, catalisando reações bioquímicas, formando receptores ou canais em membranas, proporcionando a comunicação intra/extracelular, além de poderem transportar moléculas para os diversos compartimentos celulares ou de um órgão a outro (WALSH, 2010). O desenvolvimento destas biomoléculas está principalmente relacionado aos grandes avanços na tecnologia do DNA recombinante. Em 2008, Leader e colaboradores propuseram uma classificação de todas as proteínas terapêuticas em uso, baseada na sua ação farmacológica: proteínas terapêuticas com atividade enzimática ou regulatória (ex. insulina e hormônio de crescimento), aquelas com atividade sobre alvos específicos (ex. etanercept e abciximab), vacinas (ex. antígeno de superfície da hepatite B) e proteínas de diagnóstico (ex. hormônio de liberação de glucagon). Tais pesquisadores também chamaram atenção na maneira como essas moléculas atuam, com alta complexidade e eficácia, que nenhuma droga sintética de pequena massa molecular consegue mimetizar. Tais ações as tornam bastante específicas diminuindo também os possíveis efeitos adversos. No entanto, apesar das vantagens, as proteínas terapêuticas, assim como as pequenas moléculas, devem prover pureza, segurança e potência durante o seu desenvolvimento.

Durante a produção de uma proteína terapêutica, deve ser realizada uma sequência de estudos não clínicos, que consistem na análise da segurança de utilização da droga (toxicologia e segurança farmacológica), da farmacocinética e outras bioanálises, como avaliação da imunogenicidade. Todas estas atividades são pré-requisitos para iniciar o estudo clínico de um novo biofármaco. Os objetivos destes testes são semelhantes aos de drogas de pequena massa molecular: reconhecer potenciais toxicidades (identificação, avaliação e caracterização de riscos de utilização), identificar parâmetros adequados para monitoramento clínico (biomarcadores) e contribuir para a seleção da dose que será utilizada em humanos (BAUMANN, 2009).

Como já abordado anteriormente, nosso grupo de estudo isolou uma lectina ligante a quitina, a partir de sementes de *M. oleifera*, chamada de *Mo-CBP<sub>4</sub>*, que possui grande potencial de utilização como ferramenta farmacológica contra

processos de inflamação e dor. Devido às diversas utilizações desta planta, principalmente relacionada à purificação de água, existem muitos trabalhos avaliando a toxicidade do extrato aquoso de suas sementes, constatando baixa ou nenhuma toxicidade do mesmo (SATTAUR, 1983; JAHN, 1988; FERREIRA *et al.*, 2009; ROLIM *et al.*, 2011). Contudo, um estudo para analisar possíveis efeitos tóxicos da lectina aqui estudada deve ser realizado, para seguir com seu estudo farmacológico. Assim, foram propostos alguns testes não clínicos a fim de se avaliar a segurança da utilização de *Mo*-CBP<sub>4</sub> purificada. Portanto, as atividades propostas neste capítulo tem como eixo o seguinte questionamento:

*Sabendo-se que sementes de M. oleifera apresentam baixa toxicidade oral, será que a elevada potência farmacológica de Mo-CBP<sub>4</sub> estaria aliada a uma baixa toxicidade?*

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1. Geral

Avaliar a atividade tóxica de *Mo-CBP<sub>4</sub>* visando estudar sua segurança farmacológica.

### 2.2. Específicos

- Realizar teste de toxicidade aguda de *Mo-CBP<sub>4</sub>* por via oral, em dose única, usando camundongos fêmeas;
- Realizar teste de toxicidade de *Mo-CBP<sub>4</sub>* por via oral, em doses repetidas por 28 dias, usando camundongos machos e fêmeas;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* de *Mo-CBP<sub>4</sub>*, em células tumorais e normais;
- Avaliar a genotoxicidade *in vitro* de *Mo-CBP<sub>4</sub>*.

### 3. MATERIAIS

---

#### 3.1. Animais

Camundongos Swiss (*Mus musculus*), com massa corpórea variando entre 20 e 30 g, foram fornecidos pelo Biotério Central da UFC e mantidos na sala de manutenção do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais (Bioprospec) da UFC. Os animais foram mantidos em caixas plásticas contendo água e ração *ad libitum* e aclimatados (25 °C) em ciclo claro/escuro de 12 horas, antes da realização dos experimentos. Todos os esforços foram feitos para minimizar o número e o sofrimento dos animais utilizados. Após o término dos protocolos experimentais, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

Os protocolos experimentais foram realizados em conformidade com as diretrizes atuais para o cuidado de animais de laboratório e com as diretrizes éticas para investigações experimentais da dor em animais conscientes, revisto e aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa com Animais (CEPA) da UFC, com o número de protocolo 86/10.

#### 3.2. Células

Linhagens de células leucêmicas humana (HL-60), de câncer de cólon (HCT-8) e câncer de cérebro (SF295) foram doadas pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (Bethesda, MD). Células mononucleadas de sangue periférico humano (CMSP) foram obtidas de doadores saudáveis. Hemácias para o ensaio hemolítico foram obtidas a partir de sangue de camundongos.

Células de carcinoma de mama (MCF-7) e células de carcinoma de cólon (Caco-2), ambas originadas de humanos, foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, EUA).

#### 3.3. Reagentes químicos e outros materiais

Albumina sérica bovina (BSA), aminoácidos não essenciais, Triton X-100, Ficoll®-Hypaque, penicilina e estreptomicina foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical Co (St. Louis, EUA).

Meio RPMI 1640 e soro fetal de vitelo foram obtidos da Gibco (Carlsbad, EUA).

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

## 4. MÉTODOS

---

### 4.1. Estudo de toxicidade aguda de *Mo-CBP<sub>4</sub>* (dose única) via oral em camundongos

O estudo de toxicidade aguda de *Mo-CBP<sub>4</sub>* foi baseado no guia 423 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE). Camundongos fêmeas (n = 3), pesando entre 20 e 25 g, foram submetidas a uma única dose, via oral, de 2000 mg/kg de *Mo-CBP<sub>4</sub>*, dissolvida em salina 0,9%. Um segundo grupo foi formado para receber apenas o veículo, constituindo o controle. Antes e depois da administração, os animais ficaram em jejum por 2 e 1 hora, respectivamente. Após a administração e por um período de 14 dias, os animais foram inspecionados quanto à mortalidade e variações no comportamento, tais como: piloereção, ptose palpebral, diarreia, contorção abdominal, locomoção, tônus muscular, tremor, salivação e convulsão. A massa corpórea foi mensurada nos dias 0, 7 e 14.

### 4.2. Estudo de toxicidade oral de *Mo-CBP<sub>4</sub>* em doses repetidas (28 dias) em camundongos

O estudo de toxicidade oral de *Mo-CBP<sub>4</sub>*, em doses repetidas, foi baseado no guia 407 preconizado pela OCDE (1995). Para isso, 5 grupos (n = 10; 5 machos e 5 fêmeas) foram formados, sendo 2 grupos controle (salina e BSA 100 mg/kg) e 3 experimentais (*Mo-CBP<sub>4</sub>* nas doses de 10, 40 e 100 mg/kg). Tais doses foram escolhidas de acordo com os estudos prévios, onde 10 mg/kg correspondeu a dose que inibiu 52% das contorções abdominais induzidas por ácido acético, quando a lectina foi administrada oralmente (PEREIRA *et al.*, 2011). As outras duas doses são 4 e 10 vezes maiores que a dose terapêutica. Diariamente, durante 28 dias, os animais eram deixados em jejum por 2 horas, tratados por gavagem com as respectivas amostras e deixados novamente em jejum por mais 1 hora. O peso dos animais foi verificado de 4 em 4 dias. A ração consumida foi obtida através da diferença entre a massa da ração oferecida e a massa da ração após um período de 7 dias, dividida pela massa corpórea total de todos os animais daquele grupo. Ocorrência de morte e variações comportamentais, como piloereção, ptose palpebral, diarreia, contorção

abdominal, locomoção, tônus muscular, tremor, salivação e convulsão, foram observadas e anotadas. No 28º dia, 3 animais de cada grupo foram colocados em caixas individuais para coleta de urina. No 29º dia, os animais foram deixados em jejum durante 2 horas e depois levemente sedados com éter etílico, para coleta de sangue via seio retro-orbital, a ser usado na determinação de parâmetros hematológicos e bioquímicos. Após sacrifício por deslocamento cervical, os animais foram pesados, dissecados e analisados quanto à existência de variação anátomo-morfológica nos órgãos. Fígado, rins, baço, pulmões, coração, cérebro, estômago, duodeno, jejuno, íleo, intestino grosso, pâncreas, bexiga, timo e órgãos do aparelho reprodutor masculino ou feminino foram removidos e pesados para obter a massa úmida relativa de acordo com a equação abaixo. Por fim, os órgãos foram mergulhados em formalina 10% por 24 horas e depois mantidos em álcool 70%, para posterior análise histopatológica.

$$\text{Massa úmida relativa (\%)} = \frac{\text{Massa do órgão} \times 100}{\text{Massa total do animal}}$$

#### **4.2.1. Determinação de parâmetros hematológicos**

Ao final do experimento, com ajuda de capilares heparinizados, o sangue foi coletado pelo plexo retro-orbital dos animais. Parte do sangue coletado foi colocado em microtubo contendo heparina, para análise hematológica. Uma alíquota de 15 µL de sangue de cada animal foi submetida ao analisador hematológico veterinário (Sysmex, modelo pocH-100iV Diff, Kobe, Japão). Os parâmetros hematológicos verificados foram: número de leucócitos, número de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (V.C.M), hemoglobina corpuscular média (H.C.M.), concentração de hemoglobina corpuscular média (C.H.C.M.), amplitude de distribuição das hemácias medida como coeficiente de variação (RDW-CV), número de plaquetas, número de linfócitos e número de outros leucócitos (neutrófilos, eosinófilos e monócitos).

#### **4.2.2. Determinação de parâmetros bioquímicos**

Após coleta de sangue em microtubos, estes foram deixados em geladeira em torno de 16 horas, para completa coagulação. Após centrifugação a 600 x g, por 10 minutos, o soro foi separado para análise dos seguintes parâmetros bioquímicos: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, ureia, proteína total, albumina, colesterol total, lipoproteínas de alta densidade (HDL), creatinina e triglicerídeos. O teor de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) foi estimado utilizando a equação de Friedewald (FRIEDEWALD, 1972), mostrada abaixo. As análises sorológicas foram realizadas utilizando kits (Labtest, Belo Horizonte, Brasil) específicos para cada parâmetro, seguindo as instruções do fabricante.

$$\text{LDL (mg/dL)} = \text{Colesterol total} - \text{HDL} - (\text{Triglicerídeos}/5)$$

#### **4.2.3. Análise urinária**

Foram escolhidos aleatoriamente 3 animais de cada grupo para realizar a análise urinária. Para a coleta, os animais foram colocados individualmente em gaiolas de plástico higienizadas até urinar de maneira espontânea. Imediatamente após a micção, o animal foi retirado para que não houvesse contaminação da urina. Esta foi então coletada da caixa utilizando uma pipeta. A urina foi então colocada em contato com as tiras de urianálise (Multistix® 10 SG, Bayer HealthCare, Elkhart, EUA) para a avaliação qualitativa. Os parâmetros, analisados de acordo com as especificações do fabricante, foram: glicose, bilirrubina, corpos cetônicos, densidade, sangue, pH, proteína, nitrito e leucócitos.

#### **4.2.4. Análise estatística**

Para análise comparativa da massa corpórea, ração ingerida e massa relativa dos órgãos, foi utilizado o teste de comparação múltipla de Dunnett (*two way* ANOVA). Já para os parâmetros hematológicos e bioquímicos, foi escolhida a análise de variância simples (*one way* ANOVA). Todas as análises foram realizadas pelo

programa GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA, EUA). Diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

### **4.3. Estudo da citotoxicidade de *Mo-CBP<sub>4</sub>***

#### **4.3.1. Avaliação do potencial hemolítico utilizando eritrócitos de camundongos**

Esta metodologia permite avaliar o potencial das substâncias teste em causar danos à membrana celular, seja pela formação de poros ou pela ruptura total da membrana. Para tanto, sangue foi coletado de camundongos *Swiss* (*Mus musculus*) por via retro-orbital e diluído em 30 volumes de solução salina (NaCl 0,85% + CaCl<sub>2</sub> 0,01 M). As células foram lavadas 2 vezes em solução salina, seguida de centrifugação (1500 rpm/5 minutos) para redução da contaminação plasmática. Após esse procedimento, o precipitado foi ressuspendido em salina para obter uma suspensão de eritrócitos (SE) a 2%. Esse experimento foi realizado em placa de microtitulação de 96 poços, com a concentração da substância teste variando de 1,56 a 200 µg/mL. Cada poço da 1ª fileira recebeu 100 µL da solução salina. Na 2ª fileira, os poços receberam 80 µL da solução salina e 20 µL do veículo de diluição da substância teste, neste caso, DMSO 10%. Aos poços da 3ª fileira, foram adicionados 80 µL de solução salina e 20 µL da substância teste em solução (1 mg/mL). Da 4ª fileira em diante, os poços receberam 100 µL da solução salina, excetuando-se os da última fileira, que receberam 80 µL de solução salina e 20 µL de triton X-100 1% (controle positivo). As diluições foram feitas da 3ª à 11ª cavidade, retirando-se 100 µL da solução da cavidade anterior e transferindo para a seguinte, de modo que as concentrações fossem sempre diluídas pela metade. Em seguida, 100 µL da suspensão de eritrócitos 2% foram plaqueados em todos os poços. Após incubação de 1 hora sob agitação constante à temperatura ambiente ( $26 \pm 2^\circ\text{C}$ ), as amostras foram centrifugadas (5000 rpm/ 3 minutos) e o sobrenadante foi analisado através da absorbância a 405 nm, usada para monitorar a liberação de hemoglobina.

#### **4.3.2. Análise da citotoxicidade de *Mo-CBP<sub>4</sub>* pelo teste do MTT**

O teste do MTT (Mosmann, 1983) consiste em uma análise colorimétrica, baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium (MTT) para formazan pela enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria da célula viável, permitindo, dessa maneira, a quantificação do percentual de células vivas. Para tal, foram utilizadas linhagens de células tumorais e células normais humanas.

Células mononucleadas foram obtidas do sangue periférico de voluntários sadios, após centrifugação em gradiente de Ficoll. Estas foram removidas, lavadas com tampão fosfato e ressuspensas em meio RPMI 1640, suplementado com 20% de soro fetal bovino, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina, para uma concentração final de  $3,0 \times 10^5$  células/mL. Fitohemaglutinina (3%) foi adicionada para induzir a proliferação dos linfócitos.

As linhagens celulares HL-60, HCT-8 e SF295 foram cultivadas em frascos plásticos para cultura (Corning, 25 cm<sup>2</sup>, volume de 50 mL para células aderidas e 75 cm<sup>2</sup>, volume de 250 mL para células em suspensão), utilizando o meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram incubadas em estufa a 37 °C, com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, seguida da observação do crescimento celular, com ajuda de microscópio de inversão, a cada 24 horas. Quando necessário, as células foram repicadas em meio de cultura novo, na concentração de  $0,5 - 1,0 \times 10^6$  células/mL.

As células em suspensão ou monocamadas foram distribuídas em multiplacas de 96 cavidades, numa densidade de  $0,3 \times 10^6$  células/mL para células suspensas e  $0,7 \times 10^5$  células/mL para as aderidas. Água estéril (controle negativo) ou *Mo-CBP<sub>4</sub>* foram incubadas durante 72 horas juntamente com a suspensão de células. De uma solução estoque de 5 mg/mL da lectina, foram realizadas diluições seriadas, resultando em concentrações que variaram de 0,09 a 25 µg/mL. Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas (1500 rpm/15 minutos) e os sobrenadantes descartados. Cada cavidade recebeu 200 µL da solução de MTT (10% em meio RPMI 1640) e foi incubada novamente durante 3 horas, em estufa a 37 °C, a 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as placas foram centrifugadas (3000 rpm/10 minutos), os sobrenadantes desprezados e os precipitados ressuspensos em 150 µL de DMSO. Para

quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 595 nm. Os dados foram apresentados como concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) citotóxica para 50% das células ( $\text{CI}_{50}$ ).

#### **4.3.3. Teste de viabilidade celular pelo método do ATPlite™**

Linhagens de células tumorais MCF-7 e Caco-2 foram cultivadas em frascos de cultura de 75  $\text{cm}^2$ , contendo o meio de cultura DMEM, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal de vitelo e 0,6% (v/v) de penicilina-estreptomicina (10000 unidades de penicilina e estreptomicina 10  $\text{mg/mL}$ ). Para as células Caco-2, também foi utilizado o meio DMEM, adicionado de aminoácidos não essenciais 0,0001 M. As culturas foram mantidas em estufa a 37 °C, 5% de  $\text{CO}_2$  e 100% de umidade relativa.

Para o ensaio de viabilidade, através do método do ATPlite™ (PerkinElmer, Groningen, Holanda), as células foram inicialmente tripsinizadas, quantificadas e ressuspensas em meio de cultura para as concentrações finais de 20000 e 4000 células/poço. A placa de microtitulação de 96 poços foi semeada com 100  $\mu\text{L}$  da suspensão de células e, em seguida, incubada durante 72 horas para MCF-7, ou 48 horas para as células Caco-2, a 37 °C, 5% de  $\text{CO}_2$  e 100% de umidade relativa.

Soluções estoque de  $\text{Mo-CBP}_4$  e concanavalina A (ConA), uma lectina sabidamente citotóxica, foram preparadas através da suspensão de 2,44 mg de cada proteína em 0,2 mL de PBS, resultando em soluções de 12200  $\mu\text{g/mL}$ . Em seguida, as soluções estoque foram diluídas 14,3 vezes em DMEM e, a partir destas, feitas diluições seriadas. Todas as diluições foram adicionadas às suspensões de células, resultando no volume final de 117  $\mu\text{L}$  em cada poço. A concentração final das amostras em cada poço variou de 30,6 a 244,5  $\mu\text{g/mL}$ . Foram realizados controles nas mesmas condições, contendo somente DMSO e PBS a 1,7 e 7%, respectivamente. Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi renovado, utilizando uma pipeta manual, procedendo-se com a adição a cada poço de 50  $\mu\text{L}$  de solução de lise de células de mamíferos (conteúdo do kit ATP-Lite). A placa foi agitada durante 2 minutos, usando um agitador de placas de microtitulação, seguida da adição de 50  $\mu\text{L}$  de solução de substrato (kit ATP-Lite). A placa, coberta com selo adesivo, foi novamente agitada durante 1 minuto, adaptada ao escuro durante 10 minutos e a luminescência, então, medida, utilizando um leitor de microplacas multi-modo (BIO-

TEK Synergy HT, Winooski, VT, EUA). O ensaio foi realizado em triplicata para cada amostra. Ao final do experimento, as células foram visualizadas em microscópio acoplado a uma câmera digital para analisa-las quanto a integridade celular.

#### **4.3.4. Análise estatística**

Todos as análises foram realizadas pelo programa GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA, EUA). Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) foram calculadas por análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Student-Newman-Keuls.

#### **4.4. Avaliação da atividade genotóxica de *Mo*-CBP<sub>4</sub> utilizando o ensaio do cometa**

A versão alcalina do ensaio do cometa, mais especificamente conhecido pela sigla inglesa SCGE (*Single Cell Gel Electrophoresis*), tem sido usada para avaliar a genotoxicidade *in vitro* de muitos compostos em células normais e transformadas, humanas ou animais (DAUER *et al.*, 2003). No caso do presente trabalho, o experimento foi direcionado para avaliar a genotoxicidade contra linfócitos humanos.  $\beta$ -lapachona (1,0  $\mu\text{g/mL}$  ou  $5 \times 10^{-6}$  M) foi utilizada como controle positivo.

Linfócitos foram incubados com *Mo*-CBP<sub>4</sub> (25 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ),  $\beta$ -lapachona ou água estéril, por 3 horas, a 37 °C. Ao término da incubação, foi retirada uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  de células, à qual foram adicionados 110  $\mu\text{L}$  de agarose de baixo ponto de fusão a 0,5 %, consistindo na segunda camada de agarose a ser utilizada no preparo das lâminas. A primeira camada a ser posta sobre as lâminas consistiu de uma solução de agarose de ponto de fusão normal a 1,5 %, que foi mantida à temperatura ambiente por 24 horas, para sua completa solidificação. Esta camada foi utilizada para promover a adesão da segunda camada de agarose apresentada previamente. Em seguida, as lâminas foram cobertas com lamínulas (24 x 60 mm), para uniformizar a distribuição das células, e mantidas a 4 °C até solidificação da agarose. Após isso, as lamínulas foram gentilmente removidas e as lâminas mergulhadas em solução de lise a 4 °C (mantida na geladeira), protegidas da luz por, no mínimo, 1 hora antes da corrida de eletroforese. Depois de removidas da solução de lise, as lâminas foram neutralizadas por 15 minutos em solução de neutralização e

dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese. A cuba foi mantida em banho de gelo, para a manutenção da temperatura em torno de 4 °C, tendo sido acrescentada a solução de eletroforese até a completa imersão das lâminas. Antes de iniciar a corrida da eletroforese, as lâminas ficaram em repouso por 20 minutos, para permitir o desenovelamento do DNA, o relaxamento de suas ligações e a exposição dos sítios álcali-lábeis. Posteriormente, a eletroforese foi conduzida em baixa luminosidade, usando 25 V e corrente de 300 mA, por cerca de 20 minutos. Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e mergulhadas na solução de neutralização por 5 minutos, a fim de neutralizar a alcalinidade. A fixação do material foi realizada com etanol 100%. Posteriormente, as lâminas foram coradas com 50 µL de solução de brometo de etídio (20 µg/mL) e analisadas em microscópio de fluorescência. A análise das lâminas foi realizada de acordo com o padrão de escores, previamente determinado pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa. Foram contados 100 cometas por lâmina (n = 4) e classificados dentre as cinco categorias (0, 1, 2, 3 e 4), que representam a percentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de dano sofrido pela célula, de acordo com as informações descritas a seguir:

Índice	Característica da cauda	Grau de dano do DNA
0	Sem danos ao DNA, portanto, sem cauda	< 5 %
1	Baixo nível de danos, com a cauda menor que o diâmetro da cabeça	5-20 %
2	Médio nível de danos, com a cauda representando 1-2 vezes o diâmetro da cabeça	20-40 %
3	Alto nível de danos, com a cauda representando mais de 2 vezes o diâmetro da cabeça	40-95 %
4	Dano total	> 95 %

O índice de dano (ID) foi, então, obtido utilizando a fórmula abaixo, onde  $n_i$  é o número de células com nível de dano  $i$  (0, 1, 2, 3 ou 4).

$$ID = \sum_{i=0}^4 n_i \times i ,$$

Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. de experimentos independentes (n = 2). Diferenças significativas entre os grupos foram verificadas por

análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Student-Newman-Keuls, considerando  $p < 0,05$ , usando o programa GraphPad 6.0.

## 5. RESULTADOS

---

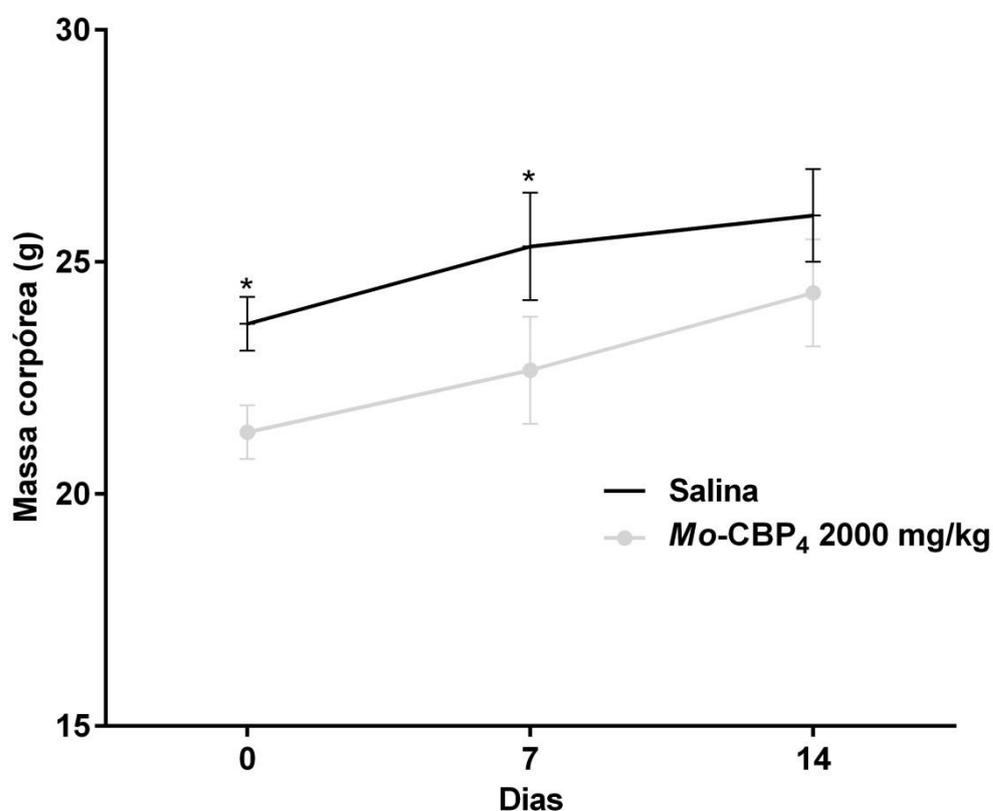
### 5.1. Estudo de toxicidade aguda de *Mo-CBP<sub>4</sub>* (dose única) via oral em camundongos

Os camundongos fêmeas que foram tratados com *Mo-CBP<sub>4</sub>*, na única dose de 2000 mg/kg, por gavagem, não apresentaram mortalidade ou variações comportamentais quando comparados aos animais que receberam apenas salina, durante os 14 dias de observação. Quanto à massa corpórea, já mesmo antes do início do experimento, os animais dos dois grupos (salina e experimental) analisados apresentavam uma discreta, porém significativa diferença. Essa diferença foi ainda visualizada no dia 7, sendo revertida ao final do experimento, quando as massas corpóreas se mostraram similares (FIGURA 1).

### 5.2. Estudo de toxicidade de *Mo-CBP<sub>4</sub>* em doses repetidas (28 dias), por via oral, em camundongos

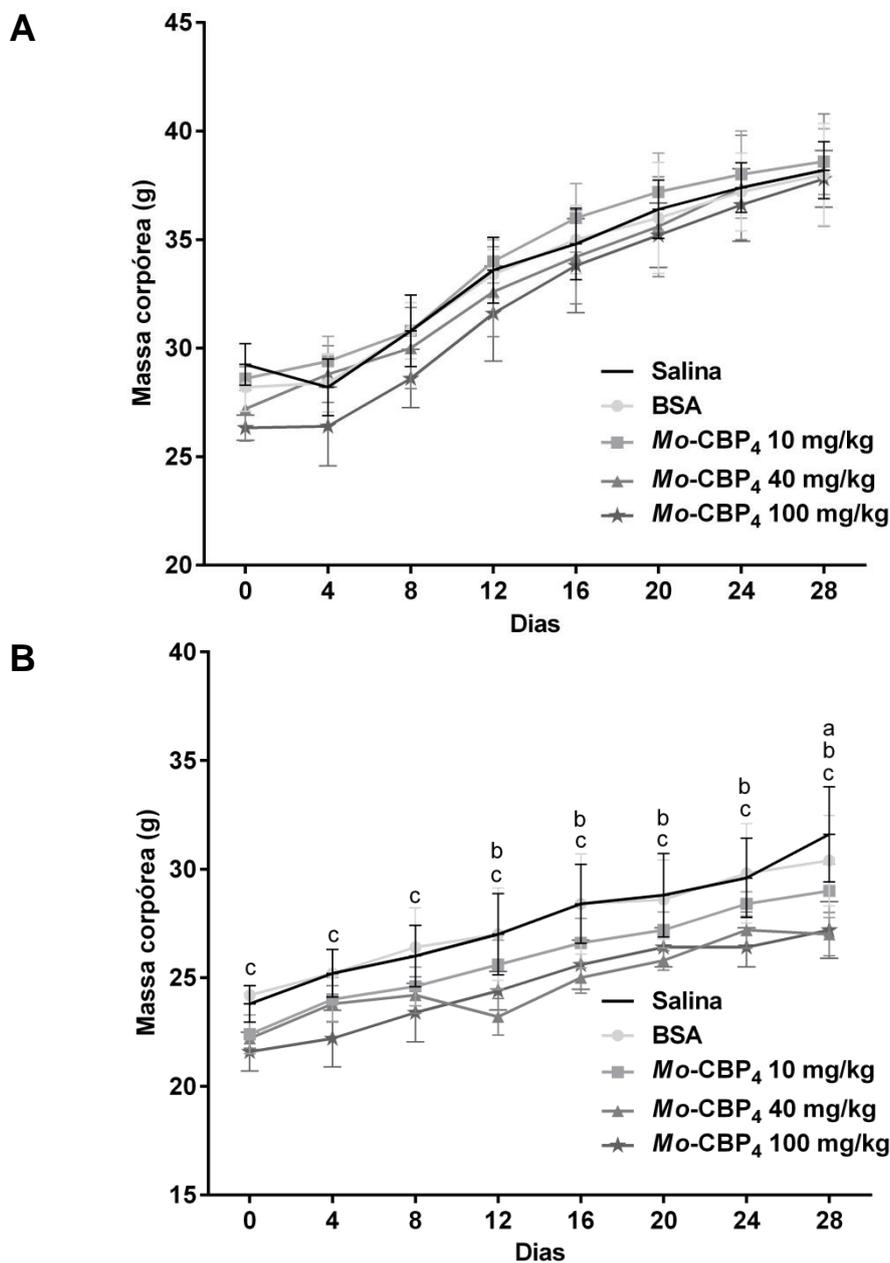
Na avaliação de toxicidade oral da proteína, através de sua administração diária por 28 dias, em três doses diferentes (10, 40 e 100 mg/kg), não foram visualizados comportamentos anormais ou sintoma de intoxicação nos animais dos grupos testes e, muito menos, nos controles (salina e BSA). A massa corpórea dos camundongos foi mensurada de 4 em 4 dias, e os dados foram plotados em gráficos separados para machos e fêmeas, representados na Figura 2. Para os machos, não houve diferença significativa para todos os grupos testados em relação ao grupo salina. Em contrapartida, as fêmeas mostraram-se sensíveis a *Mo-CBP<sub>4</sub>*, apresentando redução do ganho de massa no final do experimento para as três doses testadas. Esta diminuição foi mais proeminente para a dose de 100 mg/kg que, no último dia, resultou em uma média de  $27,2 \pm 1,3$  g contra  $31,6 \pm 2,1$  g e  $30,4 \pm 2,0$  g dos grupos salina e BSA, respectivamente.

Figura 1. Perfil do ganho de massa corpórea de camundongos tratados com única dose de *Mo*-CBP<sub>4</sub>



Camundongos fêmeas foram tratadas com uma única dose de *Mo*-CBP<sub>4</sub> (2000 mg/kg) e observadas durante 14 dias. Salina foi utilizada como controle. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 3$ ). \*Representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo salina, verificada pelo teste de Dunnett (two-way ANOVA).

Figura 2. Perfil do ganho de massa corpórea de camundongos tratados com diferentes doses de  $Mo-CBP_4$



Camundongos machos (A) e fêmeas (B) foram tratados diariamente com  $Mo-CBP_4$  (10, 40 e 100 mg/kg), via oral, durante 28 dias. Salina e BSA (100 mg/kg) foram utilizados como controles. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. (n = 5). Letras diferentes representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo salina (a:  $Mo-CBP_4$  10 mg/kg; b:  $Mo-CBP_4$  40 mg/kg; c:  $Mo-CBP_4$  100 mg/kg) pelo teste de Dunnett (two-way ANOVA).

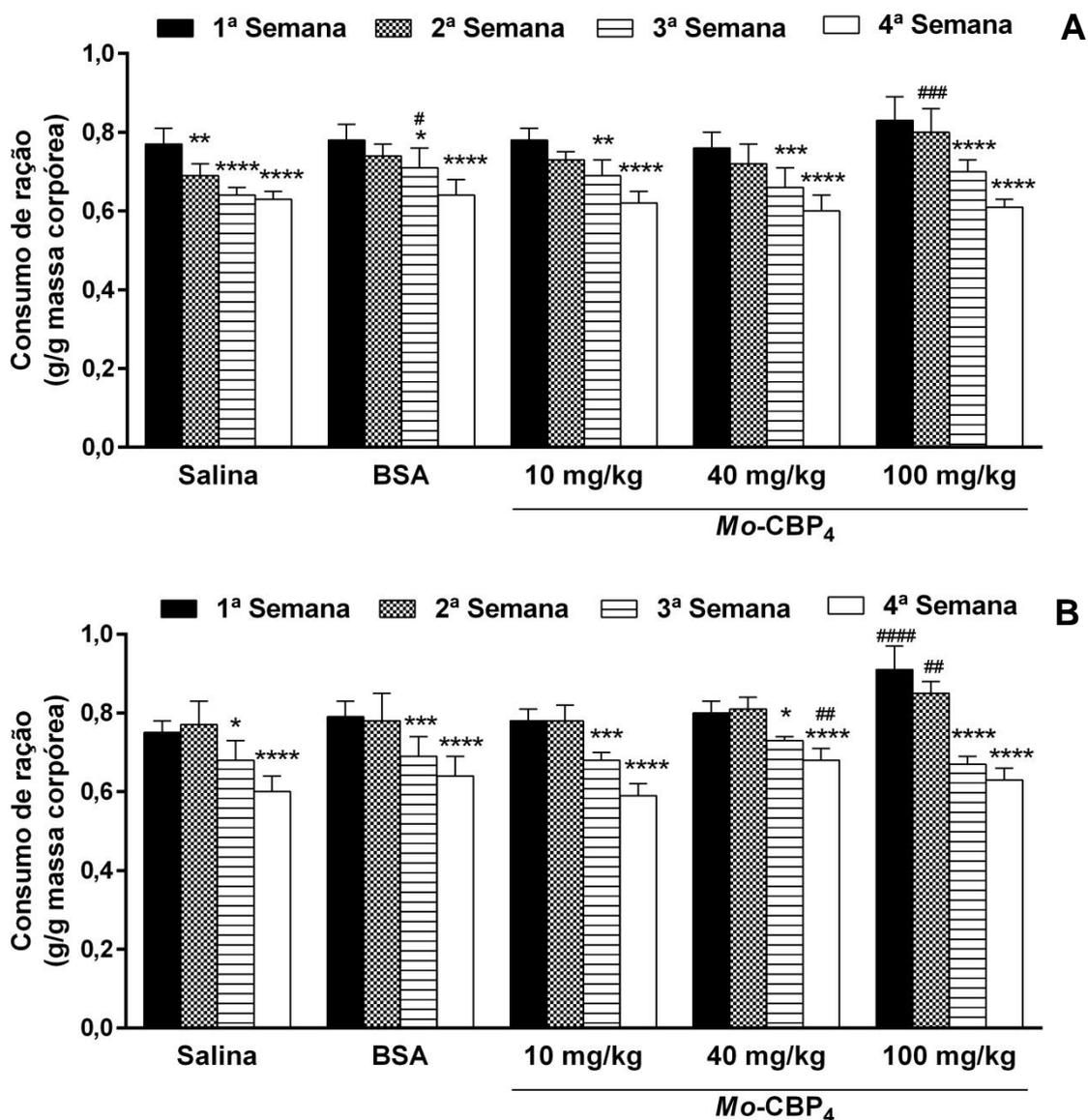
Outro parâmetro observado durante os 28 dias foi a quantidade de ração ingerida. De acordo com a Figura 3, para todos os grupos, a quantidade de ração consumida foi diminuindo ao longo do experimento, tanto para os machos quanto para as fêmeas. Foi realizada uma comparação entre os grupos que receberam proteína (BSA ou *Mo*-CBP<sub>4</sub>) e os animais tratados apenas com salina, em semanas separadas. As fêmeas que receberam *Mo*-CBP<sub>4</sub>, na dose de 100 mg/kg, ingeriram mais ração do que as que receberam salina, durante as duas primeiras semanas, diferença essa não mais visualizada na 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> semanas.

Ao final dos 28 dias, os animais foram sacrificados e seus órgãos internos dissecados, para obtenção da massa úmida dos mesmos. As Tabelas 1 e 2 mostram a massa relativa dos órgãos de camundongos machos e fêmeas, respectivamente, tratados com *Mo*-CBP<sub>4</sub> (10, 40 e 100 mg/kg), salina ou BSA (100 mg/kg). Entre os machos, em geral, não houve diferença significativa ( $p > 0,01$ ) nas massas dos órgãos analisados, excetuando-se o fígado dos animais tratados com BSA, que se apresentou mais pesado em comparação ao do grupo salina. Padrão similar foi observado para as fêmeas, que também apresentaram aumento da massa do fígado quando tratadas com BSA. Além disso, o tratamento com *Mo*-CBP<sub>4</sub> na dose de 10 mg/kg resultou na leve diminuição da massa do fígado em relação à massa referente ao grupo salina. Alteração esta não detectada nos tratamentos incluindo doses maiores da proteína teste.

### **5.2.1. Parâmetros hematológicos**

As Tabelas 3 e 4 mostram os parâmetros hematológicos obtidos para machos e fêmeas, respectivamente, ao final do experimento. Dentre os parâmetros analisados, apenas o número de plaquetas variou nos camundongos machos. Os animais que receberam *Mo*-CBP<sub>4</sub> nas doses de 40 e 100 mg/kg apresentaram  $1184,67 \pm 10,59$  e  $1109,75 \pm 50,57 \times 10^3$  plaquetas/mm<sup>3</sup>, valores superiores aos encontrados para o grupo salina ( $949,50 \pm 18,50 \times 10^3$  plaquetas/mm<sup>3</sup>), porém semelhantes aos do grupo controle BSA na dose de 100 mg/kg ( $1015,80 \pm 39,53 \times 10^3$  plaquetas/mm<sup>3</sup>). Em relação às fêmeas, não houve diferença significativa ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,001$ ) entre os parâmetros analisados, para todos os grupos avaliados.

Figura 3. Efeito no consumo de ração de camundongos tratados com diferentes doses de *Mo-CBP<sub>4</sub>*



Camundongos machos (A) e fêmeas (B) foram tratados diariamente com *Mo-CBP<sub>4</sub>* (10, 40 e 100 mg/kg), via oral, durante 28 dias. Salina e BSA (100 mg/kg) foram utilizados como controle. Os dados representam a média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 5$ ). \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  representam diferença em relação à primeira semana; ### $p < 0,001$ ; ## $p < 0,01$ ; # $p < 0,05$  representam diferenças em relação ao grupo salina na mesma semana, através do teste de Dunnett (two-way ANOVA).

**Tabela 1. Massa relativa dos órgãos (%) de camundongos machos tratados com *Mo-CBP<sub>4</sub>* em diferentes doses por 28 dias**

Órgão	Salina	BSA	<i>Mo-CBP<sub>4</sub></i>		
			10 mg/kg	40 mg/kg	100 mg/kg
<b>Baço</b>	0,179 ± 0,012	0,190 ± 0,022	0,191 ± 0,027	0,193 ± 0,058	0,207 ± 0,012
<b>Bexiga</b>	0,110 ± 0,015	0,098 ± 0,008	0,105 ± 0,015	0,092 ± 0,021	0,085 ± 0,025
<b>Cérebro</b>	1,293 ± 0,057	1,186 ± 0,085	1,202 ± 0,064	1,252 ± 0,088	1,174 ± 0,054
<b>Coração</b>	0,486 ± 0,077	0,496 ± 0,048	0,473 ± 0,050	0,451 ± 0,037	0,429 ± 0,031
<b>Duodeno</b>	0,925 ± 0,225	1,089 ± 0,168	1,201 ± 0,270	1,158 ± 0,287	1,088 ± 0,270
<b>Estômago</b>	0,722 ± 0,046	0,728 ± 0,051	0,707 ± 0,085	0,749 ± 0,099	0,779 ± 0,104
<b>Fígado</b>	4,897 ± 0,349	5,226 ± 0,355**	4,738 ± 0,329	5,050 ± 0,406	4,884 ± 0,413
<b>Íleo</b>	0,897 ± 0,119	0,902 ± 0,048	0,977 ± 0,103	0,913 ± 0,121	0,919 ± 0,124
<b>Intestino grosso</b>	1,731 ± 0,097	1,907 ± 0,194	1,726 ± 0,042	1,611 ± 0,075	1,608 ± 0,166
<b>Jejuno</b>	1,107 ± 0,120	1,127 ± 0,248	1,146 ± 0,237	1,274 ± 0,199	1,059 ± 0,294
<b>Pâncreas</b>	0,447 ± 0,058	0,465 ± 0,085	0,394 ± 0,006	0,488 ± 0,062	0,460 ± 0,061
<b>Pulmões</b>	0,449 ± 0,032	0,469 ± 0,042	0,447 ± 0,037	0,504 ± 0,046	0,462 ± 0,064
<b>Rins</b>	1,585 ± 0,133	1,575 ± 0,057	1,583 ± 0,050	1,510 ± 0,061	1,566 ± 0,150
<b>Testículos</b>	0,691 ± 0,068	0,624 ± 0,096	0,554 ± 0,035	0,531 ± 0,126	0,531 ± 0,046
<b>Timo</b>	0,196 ± 0,019	0,170 ± 0,035	0,172 ± 0,031	0,214 ± 0,014	0,163 ± 0,006
<b>Vesícula seminal</b>	0,502 ± 0,082	0,516 ± 0,087	0,463 ± 0,130	0,566 ± 0,093	0,440 ± 0,086

Os valores representam média ± desvio padrão (n = 5); \*\*Diferença significativa ( $p < 0,01$ ) em relação ao grupo salina, através do teste de Dunnett (two-way ANOVA).

**Tabela 2. Massa relativa dos órgãos (%) de camundongos fêmeas tratadas com  $Mo-CBP_4$  em diferentes doses por 28 dias**

Órgão	Salina	BSA	$Mo-CBP_4$		
			10 mg/kg	40 mg/kg	100 mg/kg
<b>Baço</b>	0,296 ± 0,085	0,278 ± 0,042	0,276 ± 0,040	0,260 ± 0,025	0,204 ± 0,032
<b>Bexiga</b>	0,078 ± 0,013	0,081 ± 0,012	0,068 ± 0,009	0,075 ± 0,025	0,063 ± 0,017
<b>Cérebro</b>	1,530 ± 0,111	1,519 ± 0,096	1,600 ± 0,065	1,651 ± 0,109	1,559 ± 0,093
<b>Coração</b>	0,569 ± 0,064	0,479 ± 0,074	0,543 ± 0,078	0,565 ± 0,092	0,447 ± 0,015
<b>Duodeno</b>	1,359 ± 0,411	1,331 ± 0,473	1,312 ± 0,373	1,384 ± 0,259	1,327 ± 0,362
<b>Estômago</b>	1,005 ± 0,123	0,828 ± 0,062	0,811 ± 0,137	0,872 ± 0,118	0,847 ± 0,026
<b>Fígado</b>	5,203 ± 0,273	5,523 ± 0,279*	4,812 ± 0,160**	5,007 ± 0,266	4,968 ± 0,270
<b>Íleo</b>	0,854 ± 0,196	1,067 ± 0,148	0,900 ± 0,127	1,071 ± 0,136	1,000 ± 0,063
<b>Intestino grosso</b>	1,838 ± 0,171	1,869 ± 0,328	1,834 ± 0,248	1,718 ± 0,219	1,760 ± 0,341
<b>Jejuno</b>	1,395 ± 0,212	1,380 ± 0,090	1,144 ± 0,194	1,343 ± 0,306	1,127 ± 0,117*
<b>Ovários</b>	0,036 ± 0,026	0,054 ± 0,038	0,060 ± 0,035	0,069 ± 0,016	0,044 ± 0,032
<b>Pâncreas</b>	0,539 ± 0,062	0,533 ± 0,085	0,520 ± 0,060	0,644 ± 0,123	0,498 ± 0,066
<b>Pulmões</b>	0,562 ± 0,085	0,531 ± 0,033	0,560 ± 0,029	0,597 ± 0,053	0,510 ± 0,022
<b>Rins</b>	1,338 ± 0,151	1,285 ± 0,068	1,221 ± 0,092	1,309 ± 0,100	1,265 ± 0,093
<b>Timo</b>	0,287 ± 0,030	0,255 ± 0,029	0,288 ± 0,054	0,235 ± 0,032	0,275 ± 0,034
<b>Útero</b>	0,289 ± 0,063	0,332 ± 0,033	0,409 ± 0,140	0,372 ± 0,082	0,354 ± 0,020

Os valores representam média ± desvio padrão (n = 5); \*\* e \*Diferenças significativas ( $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente) em relação ao grupo salina, através do teste de Dunnett (two-way ANOVA).

**Tabela 3. Parâmetros hematológicos de camundongos machos tratados com *Mo-CBP<sub>4</sub>* em diferentes doses por 28 dias**

Parâmetros	Salina	BSA	<i>Mo-CBP<sub>4</sub></i>		
			10 mg/kg	40 mg/kg	100 mg/kg
<b>Leucócitos (<math>10^3/\text{mm}^3</math>)</b>	4,63 ± 1,04	4,32 ± 0,61	4,02 ± 0,38	6,18 ± 0,22	5,98 ± 0,23
<b>Hemácias (<math>10^6/\text{mm}^3</math>)</b>	9,20 ± 0,18	8,89 ± 0,14	8,97 ± 0,30	9,01 ± 0,23	9,10 ± 0,20
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	14,44 ± 0,51	14,10 ± 0,28	14,55 ± 0,74	14,22 ± 0,38	14,12 ± 0,16
<b>Hematócrito (%)</b>	40,42 ± 1,48	39,46 ± 0,97	38,38 ± 0,71	39,76 ± 1,16	40,20 ± 0,41
<b>VCM (<math>\mu\text{m}^3</math>)<sup>a</sup></b>	42,73 ± 0,30	43,48 ± 0,60	44,20 ± 0,64	44,08 ± 0,40	44,22 ± 0,80
<b>HCM (pg)<sup>b</sup></b>	15,30 ± 0,18	15,84 ± 0,26	15,84 ± 0,22	15,78 ± 0,17	15,52 ± 0,28
<b>CHCM (g/dL)<sup>c</sup></b>	35,74 ± 0,29	35,76 ± 0,29	35,28 ± 0,30	35,76 ± 0,18	35,12 ± 0,07
<b>RDW-CV (%)<sup>d</sup></b>	14,83 ± 0,27	14,24 ± 0,27	14,62 ± 0,20	14,70 ± 0,18	14,65 ± 0,36
<b>Plaquetas (<math>10^3/\text{mm}^3</math>)</b>	949,50 ± 18,50	1015,80 ± 39,53*	927,00 ± 28,16	1184,67 ± 10,59**	1109,75 ± 50,57**
<b>Linfócitos (<math>10^3/\text{mm}^3</math>)</b>	4,30 ± 0,45	3,68 ± 0,59	3,24 ± 0,30	4,78 ± 0,13	4,82 ± 0,24
<b>Outras células (<math>10^3/\text{mm}^3</math>)<sup>e</sup></b>	1,50 ± 0,38	0,92 ± 0,15	0,78 ± 0,12	1,26 ± 0,19	1,16 ± 0,06

Os valores representam média ± desvio padrão (n = 5); \*\* e \*Diferenças significativas ( $p < 0,0001$  e  $p < 0,001$ , respectivamente) em relação ao grupo salina, através do teste de Dunnett (one-way ANOVA).

<sup>a</sup> Volume corpuscular médio;

<sup>b</sup> Hemoglobina corpuscular média;

<sup>c</sup> Concentração de hemoglobina corpuscular média;

<sup>d</sup> Amplitude de distribuição dos eritrócitos;

<sup>e</sup> Neutrófilos, basófilos e monócitos.

**Tabela 4. Parâmetros hematológicos de camundongos fêmeas tratadas com *Mo*-CBP<sub>4</sub> em diferentes doses por 28 dias**

Parâmetros	Salina	BSA	<i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub>		
			10 mg/kg	40 mg/kg	100 mg/kg
<b>Leucócitos (10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	4,86 ± 0,74	2,88 ± 0,38	4,65 ± 0,56	5,98 ± 0,68	5,24 ± 0,95
<b>Hemácias (10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	8,30 ± 0,25	8,37 ± 0,18	8,59 ± 0,24	8,70 ± 0,15	8,67 ± 0,28
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	13,20 ± 0,10	13,80 ± 0,44	13,88 ± 0,18	13,96 ± 0,26	13,78 ± 0,28
<b>Hematócrito (%)</b>	36,76 ± 0,53	38,74 ± 1,59	38,33 ± 0,57	39,34 ± 1,19	38,60 ± 1,00
<b>VCM (μm<sup>3</sup>)<sup>a</sup></b>	44,38 ± 0,76	46,22 ± 1,13	44,68 ± 1,21	45,34 ± 1,99	44,50 ± 0,41
<b>HCM (pg)<sup>b</sup></b>	15,96 ± 0,42	16,46 ± 0,25	16,18 ± 0,33	16,08 ± 0,49	15,92 ± 0,19
<b>CHCM (g/dL)<sup>c</sup></b>	35,94 ± 0,41	35,66 ± 0,36	36,23 ± 0,23	35,54 ± 0,48	35,66 ± 0,23
<b>RDW-CV (%)<sup>d</sup></b>	14,14 ± 0,67	14,20 ± 0,38	14,23 ± 0,48	14,98 ± 0,26	14,32 ± 0,26
<b>Plaquetas (10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	957,20 ± 53,32	860,00 ± 53,11	1032,20 ± 142,89	994,80 ± 135,85	1065,40 ± 69,66
<b>Linfócitos (10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	3,60 ± 0,31	2,52 ± 0,30	3,95 ± 0,48	4,44 ± 0,24	4,30 ± 0,73
<b>Outras células (10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)<sup>e</sup></b>	1,26 ± 0,46	0,45 ± 0,09	0,56 ± 0,19	1,54 ± 0,48	0,94 ± 0,22

Os valores representam média ± desvio padrão (n = 5).

<sup>a</sup> Volume corpuscular médio;

<sup>b</sup> Hemoglobina corpuscular média;

<sup>c</sup> Concentração de hemoglobina corpuscular média;

<sup>d</sup> Amplitude de distribuição dos eritrócitos;

<sup>e</sup> Neutrófilos, basófilos e monócitos.

### **5.2.2. Parâmetros bioquímicos**

As Tabelas 5 e 6 contêm os parâmetros bioquímicos determinados para machos e fêmeas, respectivamente. Em relação aos machos, algumas diferenças foram detectadas nos parâmetros relacionados aos lipídeos. A dosagem de triglicerídeos foi mais alta para os animais que receberam *Mo*-CBP<sub>4</sub> nas duas menores doses, 10 mg/kg (293,10 ± 12,65 mg/dL) e 40 mg/kg (299,47 ± 12,13 mg/dL), em relação ao grupo salina (189,03 ± 21,92 mg/dL), não tendo sido visualizada diferença para os animais que receberam a maior dose da lectina. Esse aumento também foi verificado nos animais tratados com BSA (275,75 ± 24,56 mg/dL). Para os níveis de HDL, houve um aumento nos animais tratados com a lectina, mas diferença significativa só foi observada para o grupo que recebeu *Mo*-CBP<sub>4</sub> nas doses de 10 mg/kg (65,36 ± 2,22 mg/dL) e 40 mg/kg (32,22 ± 1,70 mg/dL). Em contrapartida, diminuição da concentração desta lipoproteína foi visualizada para o grupo tratado com a proteína BSA (21,37 ± 0,92 mg/dL), mostrando-se menor que aquela encontrada para o grupo salina (29,06 ± 0,67 mg/dL). Como já esperado, também houve variação nas concentrações de LDL quando os animais foram tratados com *Mo*-CBP<sub>4</sub>, mostrando-se menores para as doses de 10 e 100 mg/kg da lectina (75,12 ± 7,57 e 111,80 ± 8,11 mg/dL, respectivamente) em relação ao grupo salina (138,46 ± 12,99 mg/dL). Já para as fêmeas, os parâmetros analisados para os grupos tratados com as amostras testes e a proteína controle (BSA) não apresentaram variação quando comparados ao controle salina.

### **5.2.3. Análise urinária**

A análise da urina foi de caráter qualitativo, utilizando tiras de multiparâmetros. De acordo com a Tabela 7, não há diferenças nos parâmetros analisados, tanto para os machos como para as fêmeas, em relação ao grupo salina.

**Tabela 5. Parâmetros séricos de camundongos machos tratados com *Mo-CBP<sub>4</sub>* em diferentes doses por 28 dias**

Parâmetros	Salina	BSA	<i>Mo-CBP<sub>4</sub></i>		
			10 mg/kg	40 mg/kg	100 mg/kg
<b>AST (UI/mL)<sup>a</sup></b>	121,35 ± 24,38	124,75 ± 8,17	89,03 ± 21,15	98,10 ± 15,39	117,38 ± 12,89
<b>ALT (UI/mL)<sup>b</sup></b>	94,21 ± 8,85	91,14 ± 3,71	91,14 ± 6,95	86,32 ± 4,78	78,43 ± 5,69
<b>Fosfatase alcalina (U/L)</b>	144,45 ± 18,66	115,36 ± 20,57	130,52 ± 22,77	102,93 ± 4,76	87,27 ± 2,87
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,94 ± 0,19	0,84 ± 0,14	0,50 ± 0,06	0,74 ± 0,17	0,51 ± 0,02
<b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>	189,03 ± 21,92	275,75 ± 24,56****	293,10 ± 12,65****	299,47 ± 12,13****	184,66 ± 4,61
<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	200,22 ± 12,02	216,30 ± 8,98	200,87 ± 10,43	236,96 ± 9,54	185,87 ± 6,21
<b>HDL (mg/dL)<sup>c</sup></b>	29,06 ± 0,67	21,37 ± 0,92*	65,36 ± 2,22**	32,22 ± 1,70*	27,49 ± 2,85
<b>LDL (mg/dL)<sup>d</sup></b>	138,46 ± 12,99	143,91 ± 5,80*	75,12 ± 7,57***	144,84 ± 12,88	111,80 ± 8,11**
<b>Albumina (g/dL)</b>	3,48 ± 0,54	3,35 ± 0,14	3,11 ± 0,06	3,51 ± 0,19	3,29 ± 0,04
<b>Proteínas totais (g/dL)</b>	5,47 ± 0,25	5,54 ± 0,18	5,00 ± 0,13	5,40 ± 0,19	5,04 ± 0,06

Os valores são média ± desvio padrão (n = 3-5); \*\*\*\* $p < 0,0001$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ , representando diferenças significativas em relação ao grupo salina, através do teste de Dunnett (one-way ANOVA ).

<sup>a</sup>Aspartato aminotransferase;

<sup>b</sup>Alanina aminotransferase;

<sup>c</sup>Lipoproteína de alta densidade;

<sup>d</sup>Lipoproteína de baixa densidade.

**Tabela 6. Parâmetros séricos de camundongos fêmeas tratadas com *Mo*-CBP<sub>4</sub> em diferentes doses por 28 dias**

Parâmetros	Salina	BSA	<i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub>		
			10 mg/kg	40 mg/kg	100 mg/kg
<b>AST (UI/mL)<sup>a</sup></b>	174,09 ± 16,98	191,67 ± 15,73	218,32 ± 40,00	219,03 ± 21,85	192,23 ± 15,57
<b>ALT (UI/mL)<sup>b</sup></b>	165,19 ± 7,35	165,19 ± 7,22	166,95 ± 5,69	144,60 ± 4,75	137,59 ± 2,34
<b>Fosfatase alcalina (U/L)</b>	84,53 ± 3,52	105,66 ± 3,60	79,06 ± 12,04	99,45 ± 14,43	65,88 ± 10,17
<b>Creatinina (mg/dL)</b>	0,50 ± 0,03	0,54 ± 0,02	0,59 ± 0,02	0,67 ± 0,08	0,56 ± 0,02
<b>Triglicerídeos (mg/dL)</b>	195,04 ± 13,93	189,03 ± 17,73	212,83 ± 17,88	188,20 ± 32,59	218,14 ± 16,21
<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	146,74 ± 1,65	171,09 ± 18,28	146,74 ± 1,54	169,78 ± 16,64	155,44 ± 6,36
<b>HDL (mg/dL)<sup>c</sup></b>	24,55 ± 1,05	25,26 ± 1,06	20,14 ± 0,98	22,43 ± 1,16	24,64 ± 1,23
<b>LDL (mg/dL)<sup>d</sup></b>	83,18 ± 3,10	123,69 ± 11,05	83,76 ± 3,99	98,35 ± 12,92	88,81 ± 6,54
<b>Albumina (g/dL)</b>	195,78 ± 11,18	188,74 ± 12,58	182,91 ± 4,32	173,47 ± 6,22	182,71 ± 3,79
<b>Proteínas totais (g/dL)</b>	4,78 ± 0,07	4,81 ± 0,13	5,20 ± 0,18	4,98 ± 0,11	4,87 ± 0,11

Os valores são média ± desvio padrão (n = 5).

<sup>a</sup>Aspartato aminotransferase;

<sup>b</sup>Alanina aminotransferase;

<sup>c</sup>Lipoproteína de alta densidade;

<sup>d</sup>Lipoproteína de baixa densidade.

Tabela 7. Análise urinária de camundongos tratados com *Mo*-CBP<sub>4</sub> em diferentes doses por 28 dias

Sexo	Tratamento	Glicose		Bilirrubina		Corpos cetônicos		Densidade	Sangue		pH	Proteína		Nitrito		Leucócitos		
		+	-	+	-	+	-		+	-		+	-	+	-	+	-	
<b>Machos</b>	Salina	0	3	0	3	0	3	1,02	0	3	7,5	3 (traços) <sup>a</sup>	0	0	3	0	3	
	BSA	0	3	0	3	0	3	1,01	0	3	8,3	3 (traços)	0	0	3	0	3	
	<i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub>	10 mg/kg	0	3	0	3	0	3	1,01	0	3	8,2	3 (traços)	0	0	3	0	3
		40 mg/kg	0	3	0	3	0	3	1,01	0	3	8,2	3 (traços)	0	0	3	0	3
		100 mg/kg	0	3	0	3	0	3	1,01	0	3	8,3	3 (traços)	0	0	3	0	3
<b>Fêmeas</b>	Salina	0	3	0	3	0	3	1,01	0	3	8,3	3 (traços)	0	0	3	0	3	
	BSA	0	3	0	3	0	3	1,01	0	3	7,3	3 (traços)	0	0	3	0	3	
	<i>Mo</i> -CBP <sub>4</sub>	10 mg/kg	0	3	0	3	0	3	1,01	0	3	8,2	3 (traços)	0	0	3	0	3
		40 mg/kg	0	3	0	3	0	3	1,01	0	3	8,3	3 (traços)	0	0	3	0	3
		100 mg/kg	0	3	0	3	0	3	1,01	0	3	8,0	3 (traços)	0	0	3	0	3

Três amostras de cada grupo foram analisadas. (+) presença, (-) ausência.

<sup>a</sup>Concentração de proteína menor que 100 mg/dL.

### **5.3. Estudo da citotoxicidade de *Mo*-CBP<sub>4</sub>**

#### **5.3.1. Potencial hemolítico em eritrócitos de camundongos**

*Mo*-CBP<sub>4</sub> não apresentou atividade hemolítica em suspensões ( 2%) de eritrócitos. A concentração máxima de proteína foi de 200 µg/mL. Triton X-100, um detergente utilizado como controle positivo, representou lise total das células.

#### **5.3.2. Análise da citotoxicidade de *Mo*-CBP<sub>4</sub> pelo teste do MTT**

A citotoxicidade da proteína estudada no presente trabalho foi acessada através do teste do MTT, utilizando doxorubicina como controle positivo. Não foi possível determinar a CI<sub>50</sub> de *Mo*-CBP<sub>4</sub>, para nenhuma das linhagens celulares testadas (incluindo linfócitos humanos saudáveis), pois na máxima concentração utilizada (25 µg/mL), a absorbância a 595 nm foi semelhante a da água (controle negativo), sugerindo ausência de toxicidade. Doxorubicina apresentou considerável citotoxicidade para todas as células testadas (TABELA 8).

#### **5.3.3. Teste de viabilidade celular pelo método do ATPlite™**

A atividade citotóxica de *Mo*-CBP<sub>4</sub> também foi analisada pelo método do ATPlite™. Foram utilizadas as linhagens MCF-7 e Caco-2, correspondendo às células de carcinoma humano de mama e cólon, respectivamente. A viabilidade das células incubadas com *Mo*-CBP<sub>4</sub> e ConA foi quantificada para quatro concentrações diferentes, cujos resultados estão mostrados na Figura 4. Em relação à linhagem MCF-7, *Mo*-CBP<sub>4</sub> não foi capaz de reduzir a viabilidade celular para menos de 80%. Em contrapartida, as células incubadas com ConA, nas concentrações de 61,1, 122,3 e 244,5 µg/mL, tiveram a viabilidade reduzida para 72,7 ± 6,5, 69,6 ± 5,6 e 58,1 ± 3,7%, respectivamente. Para Caco-2, redução da viabilidade celular para menos de 80% foi observada com ConA, porém apenas na dose de 244,5 µg/mL (68,2 ± 10,9%). Já *Mo*-CBP<sub>4</sub> não influenciou na viabilidade destas células.

**Tabela 8. Atividade citotóxica, utilizando o método do MTT em diferentes linhagens de células humanas, após 72 horas de incubação**

<b>Amostras</b>	<b>HL-60<sup>a</sup></b>	<b>HCT-8<sup>b</sup></b>	<b>SF-295<sup>c</sup></b>	<b>CMSP<sup>d</sup></b>
<b><i>Mo-CBP<sub>4</sub></i></b>	ND	ND	ND	ND
<b>Doxorrubicina</b>	0,03	0,02	0,40	0,97

Os resultados estão representados como valores de concentração ( $\mu\text{g/mL}$ ) citotóxica para 50% das células ( $CI_{50}$ ) e intervalo de confiança de 95%. Os experimentos foram feitos em duplicata. ND representam valores de  $CI_{50} > 25 \mu\text{g/mL}$ .

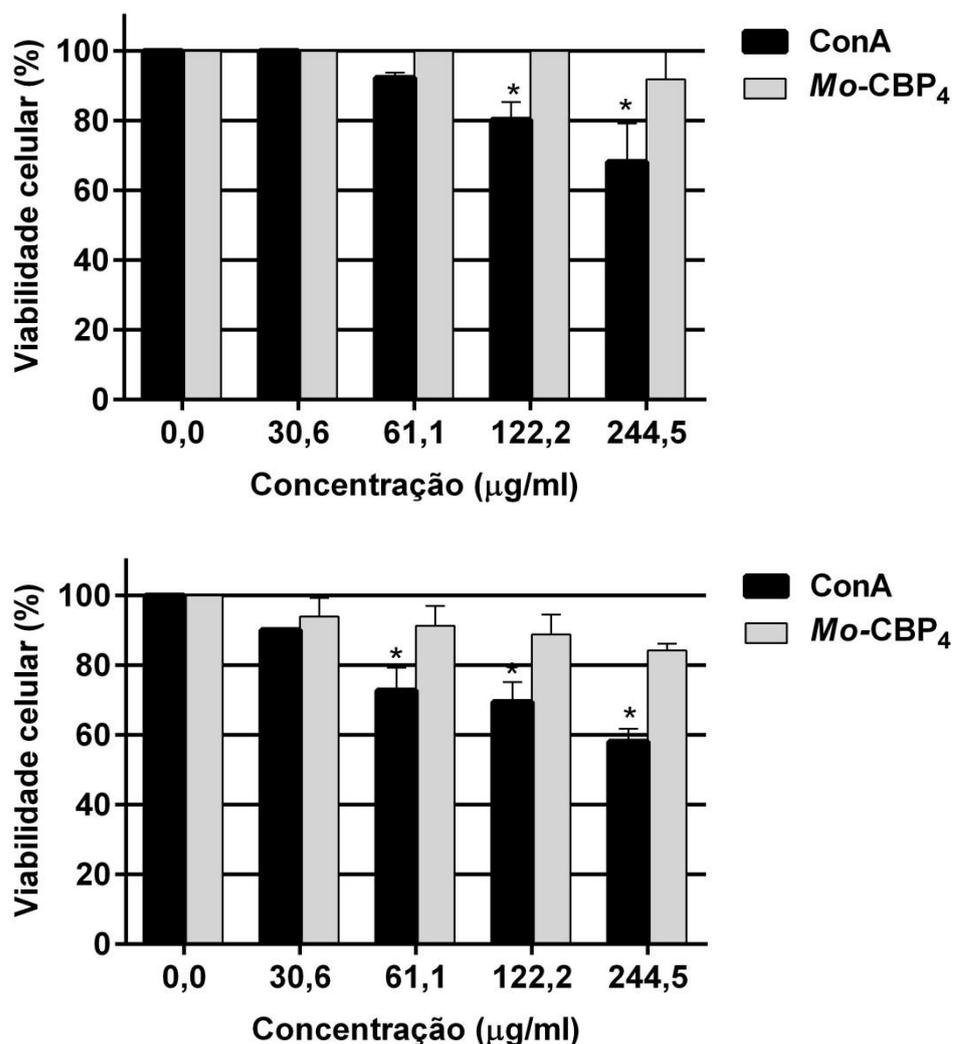
<sup>a</sup>Células leucêmicas;

<sup>b</sup>Células de câncer do cólon;

<sup>c</sup>Células de câncer de cérebro;

<sup>d</sup>Linfócitos saudáveis.

Figura 4. Avaliação da atividade citotóxica de *Mo*-CBP<sub>4</sub> utilizando o método do ATPlite™



Linhagem de células Caco-2 (A) e MCF-7 (B) foram incubadas com *Mo*-CBP<sub>4</sub> e ConA (controle) nas concentrações 30,6, 61,1, 122,3 e 244,2 µg/mL e depois de 24 horas a viabilidade celular foi avaliada através do conteúdo de ATP intracelular, utilizando o kit ATPlite™. As colunas verticais representam média ± desvio padrão. \*Representa viabilidade celular menor que 80%.

Com a finalidade de confirmar os resultados obtidos por ATPlite™, células da linhagem MCF-7 (que apresentaram maior sensibilidade a ConA) foram visualizadas em microscópio acoplado a uma câmera digital e analisadas quanto à integridade celular. A Figura 5 mostra micrografias de células expostas a PBS (controle) e às lectinas (ConA e *Mo*-CBP<sub>4</sub>), na concentração de 244,5 µg/mL. Enquanto a integridade da membrana das células incubadas com PBS ou *Mo*-CBP<sub>4</sub> praticamente não foi alterada, houve diminuição acentuada de citoplasma das células tratadas com ConA, o que corrobora com os resultados obtidos no teste do ATPlite™.

#### **5.4. Avaliação da atividade genotóxica de *Mo*-CBP<sub>4</sub> utilizando o ensaio do cometa**

Para verificar a ocorrência de dano ao DNA de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) em condições alcalinas, após 3 horas de tratamento com *Mo*-CBP<sub>4</sub> ou β-lapachona, foi utilizado o teste do cometa. A lectina, nas duas concentrações testadas, não apresentou atividade genotóxica, desde que os índices de dano foram semelhantes ao da água estéril, usada como controle negativo (FIGURA 6). Em contrapartida, β-lapachona apresentou alta genotoxicidade para estas células, com um índice de dano em torno de  $20,62 \pm 9,32$ , quando comparado ao controle negativo ( $6,75 \pm 2,31$ ).

Figura 5. Fotografia de células de carcinoma de mama MCF-7 expostas às lectinas *Mo-CBP<sub>4</sub>* e ConA

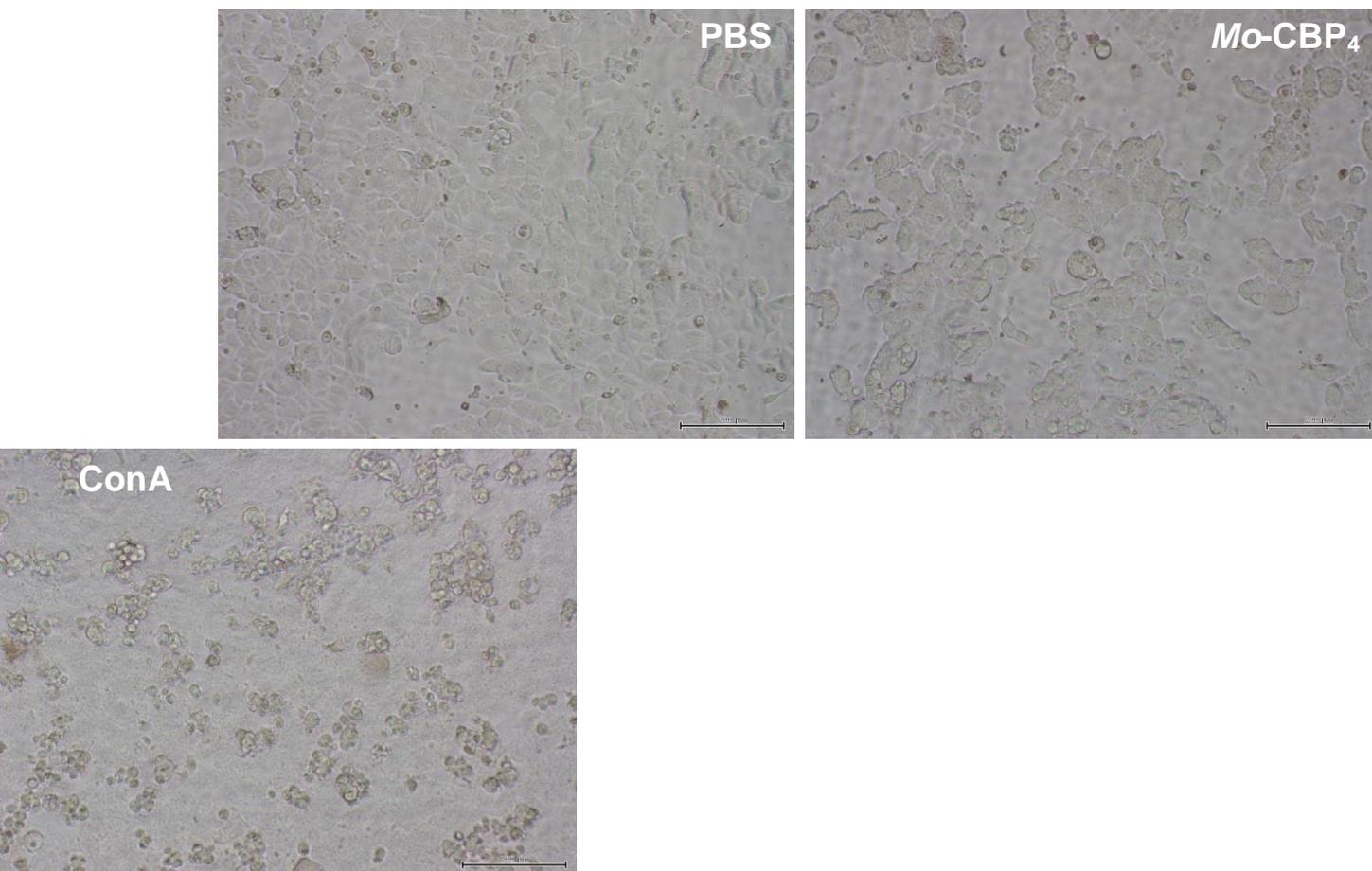
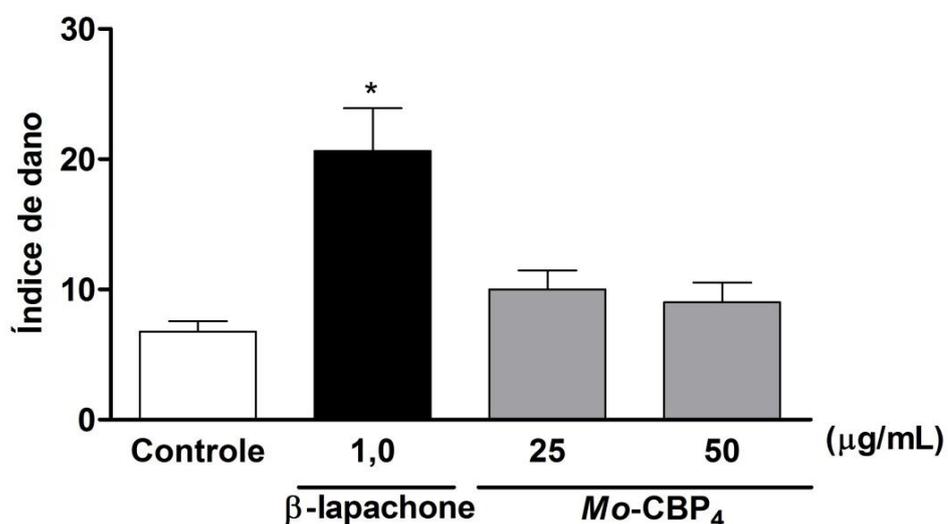


Figura 6. Avaliação da atividade genotóxica de *Mo*-CBP<sub>4</sub> utilizando o teste do cometa



Índice de dano ao DNA após 3 horas de exposição a  $\beta$ -lapachona (controle positivo; 1,0  $\mu\text{g/mL}$ ) ou *Mo*-CBP<sub>4</sub> (25 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ), usando a versão alcalina do teste do cometa. \*Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao controle negativo, verificada por ANOVA, seguida do teste de Student -Newman-Keuls.

## 6. DISCUSSÃO

---

O processo de pesquisa e desenvolvimento de um novo fármaco é longo, árduo e dispendioso, sendo normalmente dividido em várias etapas, com postos de controle entre cada um delas, para gerenciar os riscos e custos. Após a identificação de um candidato a fármaco, inicia-se um extenso processo de testes de segurança e caracterização do composto selecionado por meio de estudos pré-clínicos, as fases 1, 2 e 3 de estudos clínicos para, finalmente, ocorrer a liberação de seu uso em pacientes, que acarretará na fase 4, consistindo de monitoramento pós-lançamento no mercado. Especialmente para os medicamentos anti-inflamatórios, esta fase de segurança do uso é essencial, levando-se em conta que as doenças inflamatórias são, muitas vezes, de natureza crônica, precisando-se de um uso contínuo dos mesmos (KNOWLES, 2013). Em relação à fase pré-clínica, segundo a agência regulamentadora norte-americana *Food and Drug Administration* (FDA), os principais objetivos são: 1) identificar uma dose inicial segura e, subsequentemente, esquemas de doses que serão testadas em humanos; 2) identificar potenciais órgãos alvo e reversibilidade da toxicidade e 3) identificar parâmetros confiáveis para o monitoramento clínico.

Os testes supracitados também devem ser abordados aos biofármacos, definidos como produtos farmacêuticos derivados de (glico)proteínas e/ou ácidos nucleicos (SCHELLEKEN, 2002). No entanto, os testes não clínicos devem ser adaptados a tais moléculas em relação aos utilizados corriqueiramente para moléculas sintéticas ou de baixa massa molecular, devido às características inerentes a estes fármacos. Apenas para ilustrar a complexidade destas drogas, proteínas terapêuticas, por exemplo, são moléculas formadas por L-aminoácidos e diferentes moléculas de carboidratos. Eles formam estruturas tridimensionais que consistem em estrutura secundária ( $\alpha$ -hélices e folhas- $\beta$ , por exemplo), estrutura terciária (enovelamento da estrutura secundária em configurações mais complexas) e, em alguns casos, estrutura quaternária (junção de diferentes monômeros). Tais estruturas não são encontradas para drogas de pequena massa molecular (CROMMELIN *et al.*, 2003). Assim, diferenças nas propriedades físico-químicas podem resultar em variações na farmacocinética, toxicidade e imunogenicidade desses biofármacos (BAUMAM, 2008).

*M. oleifera* é uma planta com múltiplas utilizações, sendo a mais relatada sua propriedade de flocular material suspenso na água, deixando-a própria para o consumo. Portanto, muitos estudos têm sido realizados a fim de avaliar a segurança de sua utilização. As primeiras pesquisas foram feitas testando-se a toxicidade aguda e subaguda de farinhas de semente em azeite de oliva, nas doses de 50 e 500 mg/kg, via oral, em ratos, o que resultou em nenhum efeito tóxico, apenas no aumento da massa corpórea dos animais (BERGER *et al.*, 1984). Posteriormente, Oliveira e colaboradores (1999), investigando aspectos antinutricionais e/ou tóxicos das sementes, mostraram que ratos alimentados por elas, como fonte única de proteínas, apresentaram perda de apetite, comprometimento do crescimento, diminuição da NPU (*Nitrogen Production Units*) e aumento de alguns órgãos como estômago, intestinos, pâncreas, rins, coração e pulmões; além disso, foram constatados atrofia de baço e timo em comparação com os ratos alimentados com dieta contendo clara do ovo como fonte proteica. No entanto, no estudo citado, a quantidade de farinha de sementes consumida por dia foi em torno de 12182,6 mg/kg, o que corresponde a 24 vezes a quantidade mais elevada utilizada no estudo de Berger e colaboradores (1984). Relatos mais recentes demonstraram que extrato aquoso de sementes de *M. oleifera* (700 mg/kg) causou baixa e mesmo nenhuma toxicidade quando administrado via oral em camundongos e ratos, respectivamente (FERREIRA *et al.*, 2009).

O presente trabalho teve como proposta principal estudar o potencial farmacológico da Mo-CBP<sub>4</sub>, uma proteína ligante à quitina de sementes de *M. oleifera*. Como parte essencial deste estudo, foi incluída sua análise toxicológica, considerada uma etapa importante na proposição do uso seguro de tal proteína. Uma das dificuldades encontradas para o início desta avaliação foi saber se a toxicidade de Mo-CBP<sub>4</sub> deveria ser avaliada utilizando protocolos elaborados especialmente para biofármacos (por se tratar de uma proteína) ou guias de fármacos em geral. Para resolver este impasse, foram considerados aqui estudos-chave, realizados tanto para o desenvolvimento não clínico de um biofármaco, como para drogas de pequena massa molecular.

Inicialmente, foram realizados os testes de dose única (toxicidade aguda) e em doses repetidas (por 28 dias), ambos por via oral, utilizando como referência os guias 423 e 407, respectivamente, da OCDE. Estes protocolos são testes bases exigidos por agências reguladoras como a FDA e a ANVISA, como parte de estudos não clínicos para a aprovação de novos fármacos.

O princípio do teste de toxicidade aguda consiste em administrar uma única dose da amostra em grupo de 3 animais (de preferência fêmeas) e, a medida em que seja mantida 100% de sobrevivência, aumenta-se a dose, chegando a um máximo de 2000 mg/kg. No presente trabalho, *Mo-CBP<sub>4</sub>* foi testada já na dose máxima, pois estudos anteriores realizados em nosso grupo mostraram que tal proteína, quando administrada via i.p. (10 e 100 mg/kg) ou e.v. (10 mg/kg), não resultou em variações comportamentais, ganho ou perda de peso e alteração de parâmetros hematológicos ou bioquímicos em relação ao grupo controle (COELHO, 2013). *Mo-CBP<sub>4</sub>*, portanto, não causou mortalidade quando administrada por gavagem em uma única dose de 2000 mg/kg, categorizando-a no grupo 5 do guia da OCDE, ou seja, nenhuma toxicidade. Além disso, os camundongos não apresentaram variação de comportamento ao longo dos 14 dias de experimento. Em relação à massa corpórea, ao final do estudo os animais que receberam a proteína mostraram pesos similares aos do grupo controle (salina).

Passou-se, então, para o teste de toxicidade em doses repetidas. O desenho experimental levou em consideração tanto a dose anti-inflamatória e antinociceptiva via oral, obtida no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético (10 mg/kg), como a dose terapêutica, verificada nos testes realizados com peritonite e hipernocicepção mecânica, abordados no Capítulo 3 do presente trabalho (40 mg/kg). Além disso, foi seguido o protocolo do guia 423 da OCDE, ao utilizar 4 e 10 vezes a dose terapêutica, via oral, obtida em estudos preliminares (PEREIRA *et al.*, 2011). BSA foi utilizada como controle, por se tratar de uma proteína com baixa ou nenhuma toxicidade. Antes da administração das amostras, que foi realizada diariamente e sempre no mesmo horário, os animais foram mantidos em jejum por 2 horas para esvaziamento do trato gastrointestinal. Após 1 hora da administração das amostras, os camundongos foram observados, porém nenhuma variação comportamental foi visualizada durante os 28 dias de experimento, quando comparados os animais dos grupos experimentais e controles. Em relação ao ganho de massa corpórea, apenas as fêmeas que receberam *Mo-CBP<sub>4</sub>*, nas três doses, mostraram diferença em relação ao grupo controle. Na maior dose (100 mg/kg), essa diferença foi ainda mais acentuada, contudo os animais que faziam parte deste grupo, desde o início do experimento já apresentavam massa inferior quando comparado ao grupo de referência.

A quantidade de ração ingerida também foi outro parâmetro analisado. Pelo menos uma vez por semana a ração consumida pelos animais era contabilizada. Todos os grupos apresentaram o mesmo perfil alimentar, pois reduziram a comida ingerida ao longo do experimento. Tal redução pode estar associada com o estresse provocado pela repetição da gavagem orogástrica, acarretando desconforto dos animais para deglutir o alimento (De MEIJER *et al.*, 2010). Assim, a diminuição do ganho de massa apresentado pelas fêmeas que receberam a lectina parece não estar relacionada com a quantidade de ração ingerida, desde que redução significativa da ingestão de comida não foi observada. Pelo contrário, os animais que receberam a maior dose de *Mo-CBP<sub>4</sub>*, nas duas primeiras semanas, se alimentaram mais do que o grupo controle (salina). A quantidade de água consumida durante os 28 dias de experimento também foi monitorada uma vez por semana, porém não apresentou nenhuma variação entre os grupos testados (dado não mostrado).

O conhecimento de que algumas lectinas são tóxicas para animais superiores é bastante relatado, sendo muitas dessas proteínas provenientes de plantas, constituindo o arsenal químico de defesa contra herbívoros e fitopatógenos. Animais experimentais alimentados com dietas contendo lectinas vegetais apresentaram sinais típicos de toxicidade aguda, como náusea, inchaço, vômito e diarreia, além de diminuição de massa corpórea e perda de apetite (VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004). A proteína do presente estudo, administrada via oral em camundongos, diferente de outras lectinas, não causou perdas expressivas da massa corpórea, particularmente se considerados os animais machos.

No 29º dia, após o sacrifício, os animais foram pesados e dissecados para obtenção da massa relativa dos seguintes órgãos: baço, bexiga, cérebro, coração, estômago, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo, separadamente), intestino grosso, pâncreas, pulmões, rins e timo. Ovários e útero representaram o sistema reprodutor feminino, enquanto que testículos e vesícula seminal constituíram o sistema reprodutor masculino. Essa análise de órgão foi realizada, por muitos deles serem alvos de lectinas vegetais, que apresentam resistência à proteólise e estabilidade em variação de pH. Administração oral ou parenteral de algumas lectinas, como WGA, ConA, ConBr (aglutinina de *C. brasiliensis*), SBA (aglutinina de soja), e PNA (aglutinina de amendoim), resultou no aumento do intestino delgado de ratos (PUSZTAI, 1991; GRANT, 1991, 1999). Um representativo crescimento hiperplásico do intestino delgado também foi observado em animais que receberam lectina de

*Viscum album* via oral, provavelmente acarretado pela ávida ligação que esta proteína tem pelas células epiteliais intestinais (PUSZTAI *et al.*, 1998). Hipertrofia de pâncreas associada ao aumento de colecistocinina sérica também foi observada em estudos que incluíram lectinas purificadas em dietas oferecidas a ratos (OLIVEIRA *et al.*, 1994; VASCONCELOS *et al.*, 2001; KELSALL *et al.*, 2002). Uma notável mudança anatômica causada por lectinas presentes em dietas foi a atrofia do timo, um órgão relacionado com o sistema imune do animal, não estando claro como essas proteínas agem para acarretar tal transformação (OLIVEIRA *et al.*, 1994; VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004). Aumento no tamanho do fígado parece ser outro efeito sistêmico provocado por lectinas de plantas, podendo estar relacionado com os distúrbios metabólicos em geral causados por estas proteínas (PUSZTAI, 1991; GRANT *et al.*, 1995). Por último, hipertrofia de pulmão foi detectada em ratos que ingeriram lectina de *V. album* (PUSZTAI *et al.*, 1998). Diante destes fatos e dos resultados obtidos para *Mo-CBP<sub>4</sub>*, pode ser dito que esta lectina não induziu alteração na massa de órgãos corriqueiramente afetados por outras lectinas, tanto em relação aos camundongos machos como fêmeas, quando comparados com o grupo salina.

Adicionalmente, foi realizada análise macroscópica dos órgãos dissecados, não tendo sido visualizada nenhuma alteração morfológica. É sabido que o uso de anti-inflamatórios não esteroidais aumenta os riscos de lesões gástricas, devido aos efeitos colaterais decorrentes da inibição da síntese de prostaglandinas que protegem a mucosa gástrica (SÜLEYMAN; DEMIRCAN; KARAGÖZ, 2007). Diferente de outras drogas anti-inflamatórias, *Mo-CBP<sub>4</sub>*, nas três doses testadas não foi capaz de causar lesões estomacais em camundongos machos e fêmeas.

Também foi realizada a análise de parâmetros hematológicos em todos os animais. Em relação aos machos, apenas o número de plaquetas foi encontrado aumentado para os grupos tratados com *Mo-CBP<sub>4</sub>* (40 e 100 mg/kg) e BSA, quando comparados ao grupo salina. Quantidade elevada de plaquetas é chamada de trombocitopenia e, geralmente, está relacionada com uma doença chamada policitemia, estando tal desordem sempre acompanhada de aumento no número de leucócitos e eritrócitos (GONZÁLEZ; SILVA, 2008), o que não foi visualizado nos grupos testados. Além disso, é razoável levar em conta os valores de referências do número de plaquetas para camundongos encontrados em outros trabalhos. Por exemplo, um estudo realizado para avaliar valores mínimos e máximos dos principais parâmetros hematológicos de camundongos saudáveis do Laboratório Charles River

mostrou que o número de plaquetas é considerado normal se estiver dentro da faixa de  $638 - 1177 \times 10^3/\text{mm}^3$  (CLIFFORD; GIKNIS, 2008). Assim, todos os valores encontrados apresentam-se dentro da normalidade. Em relação às fêmeas, nenhum parâmetro diferiu dos valores obtidos para o grupo controle.

Quando investigadas a eficácia e segurança do uso de sementes de *M. oleifera* no tratamento da asma brônquica em humanos, foi observado para a maioria dos pacientes que usaram sachês contendo o pó da amêndoa aumento nos valores de hemoglobina e taxa de sedimentação de eritrócitos diminuída (AGRAWAL; MEHTA, 2008). Tal perfil não foi encontrado para os animais tratados com *Mo*-CBP<sub>4</sub>.

Quanto aos parâmetros bioquímicos, o perfil lipídico do soro foi o que mostrou alteração mais pronunciada, particularmente nos camundongos machos. Os níveis de triglicerídeos foram maiores para os animais tratados com *Mo*-CBP<sub>4</sub>, nas doses de 10 e 40 mg/kg, quando comparados ao grupo salina. Porém, tal resultado também foi encontrado para o grupo que recebeu BSA, usada aqui como proteína padrão. Além disso, na dose mais alta de *Mo*-CBP<sub>4</sub> (100 mg/kg), que era esperado maiores efeitos deletérios, não foi visualizado aumento de triglicerídeos. Os níveis de HDL tenderam a aumentar nos animais que receberam a lectina, porém apenas nos grupos que foram tratados com 10 e 40 mg/kg. Já para o grupo tratado com BSA, foi mostrada uma diminuição nos níveis dessa lipoproteína no soro dos animais. O níveis de LDL nos animais que receberam a lectina, nas doses de 10 e 100 mg/kg, tenderam a diminuir, mostrando diferença significativa do grupo salina. As fêmeas tratadas com a lectina ou proteína padrão não foram afetadas quanto aos parâmetros bioquímicos séricos avaliados. Vários estudos reportam a atividade hipolipidêmica de *M. oleifera*. Extrato das folhas foi capaz de diminuir a massa corpórea e massa relativa do coração, reduzindo os níveis de triglicerídeos e colesterol do soro de animais experimentais (ARA *et al.*, 2008). Coelhos alimentados com dieta padrão e hipercolesterolêmica, após ingerirem sementes cozidas de *M. oleifera* (200 mg/kg/dia, v.o.), apresentaram níveis de colesterol, triglicerídeos, LDL e VLDL reduzidos no soro, além de aumento das taxas de HDL. O aumento deste parâmetro é um dos critérios desejáveis para um agente hipocolesterolêmico ideal, desde que quanto maior esta taxa, menor é o risco aterosclerótico (MEHTA *et al.*, 2003). Assim, como *Mo*-CBP<sub>4</sub> foi capaz de modificar os níveis de HDL e LDL do soro dos animais experimentais, estudos futuros avaliando essa atividade hipocolesterolêmica devem ser delineados.

A análise urinária, avaliada de forma qualitativa, não resultou em variação entre os grupos que receberam proteínas ou apenas salina nos dez parâmetros avaliados, tanto para as fêmeas quanto para os machos.

Com os resultados obtidos do ensaio de toxicidade em doses repetidas, convém ser colocado que *Mo-CBP<sub>4</sub>*, na dose 10 vezes maior que a terapêutica, não se mostra tóxica para camundongos machos e fêmeas, parecendo ser segura quanto ao seu uso. O NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) da lectina neste estudo foi de 100 mg/kg.

Além dos testes de toxicidade *in vitro*, os efeitos tóxicos *in vivo* de *Mo-CBP<sub>4</sub>* foram avaliados, utilizando células de camundongos ou humanas, saudáveis ou cancerígenas. O primeiro experimento tratou de estudar o potencial hemolítico da lectina, utilizando eritrócitos de camundongos. Mesmo na maior concentração (200 µg/mL), *Mo-CBP<sub>4</sub>* não foi capaz de lisar eritrócitos, ao contrário do detergente Triton X-100, utilizado como substância padrão (controle positivo) neste tipo de teste.

Como a morte da célula pode ser proveniente de outras causas, além da lise da membrana plasmática, foi realizado mais um teste de citotoxicidade, desta vez utilizando o sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio ou MTT. Quando células estão viáveis, a enzima succinil-desidrogenase presente na mitocôndria transforma este sal em cristais de formazam que, depois de solubilizado em DMSO, se apresenta em uma coloração roxa, mensurada por espectrofotometria. *Mo-CBP<sub>4</sub>*, na maior concentração (25 µg/mL) testada, não foi capaz de interferir na viabilidade de células normais ou cancerígenas. Doxirrubicina foi o composto utilizado como controle positivo. Trata-se de uma molécula classificada como antraquinona, bastante utilizada no tratamento contra o câncer, devido ao seu amplo espectro de atividade antitumoral. Esta molécula interage com o DNA nuclear, resultando em dano do mesmo, além de induzir a formação de radicais livres, responsáveis pelo estresse oxidativo da célula (BERETTA; ZUNINO, 2008).

Algumas lectinas de plantas são potencialmente citotóxicas. Proteínas inativadoras de ribossomos do tipo II (RIPs II) são lectinas que possuem duas cadeias distintas: a cadeia A, responsável pela atividade enzimática capaz de causar dano no RNA ribossomal e, assim, inibir a síntese proteica; e cadeia B, contendo o sítio lectínico capaz de se ligar a glicoproteínas presentes na superfície da célula, mediando o transporte da cadeia A para o citosol e consequente ação citotóxica (OLNES, 2004). Como exemplos desse tipo de lectina podem ser citadas a ricina (de

*Ricinus communis*) e viscumina (de *Viscum album*). A WGA, que assim como *Mo*-CBP<sub>4</sub> é uma proteína ligante à quitina, apresentou notável toxicidade às células de câncer de pâncreas e de mama, de origem humana, *in vitro* (SCHUWARZ *et al.*, 1999; ZALATNAI *et al.*, 2001). Recentes estudos avaliaram o efeito antiproliferativo da ConA e ConBr em células leucêmicas humanas, através do teste do MTT, resultando em citotoxicidade com CI<sub>50</sub> de 3 e 20 µg/mL, respectivamente (FAHEINA-MARTINS *et al.*, 2012). Todas estas lectinas são estudadas como potenciais drogas antineoplásicas.

Para constatar a ausência de citotoxicidade de *Mo*-CBP<sub>4</sub>, foi realizado outro teste de viabilidade celular, usando linhagens humanas de carcinoma de mama (MCF-7) e cólon (Caco-2). Estas últimas são conhecidas por apresentarem várias características semelhantes às células do epitélio intestinal que, por sua vez, são os principais alvos de lectinas de planta presentes na alimentação (HART *et al.*, 1988; FARIAS, 2013). O teste baseou-se em monitorar a produção de ATP, presente em células metabolicamente ativas. Quando o ATP entra em contato com os reagentes D-luciferina e luciferase (do Kit ATPlite™), estes reagem e liberam energia em forma de luz, que é quantificada. A luz emitida é diretamente proporcional à concentração de ATP. ConA foi utilizada como controle positivo ou lectina padrão, por apresentar ação citotóxica. Diferentemente do verificado com a ConA, *Mo*-CBP<sub>4</sub> não afetou a viabilidade celular, mesmo na maior concentração (244,5 µg/mL).

Como já mencionado, sabe-se que a maioria do biofármacos produzidos trata-se de macromoléculas recombinantes provenientes de proteínas humanas e, por isso, testes de genotoxicidade geralmente não são necessários nos ensaios não clínicos de segurança. Porém, a proposta da utilização de *Mo*-CBP<sub>4</sub> como biofármaco não pode descartar a possibilidade de dano no material genético de células humanas, por se tratar de uma molécula exógena. Portanto, foi realizado o teste do cometa, para avaliar possíveis danos ao DNA de linfócitos saudáveis humanos. *Mo*-CBP<sub>4</sub> pareceu não afetar o material genético de linfócitos, desde que apresentou índice de dano semelhante ao do controle negativo. β-lapachona é uma naftoquinona natural altamente genotóxica e foi utilizada como controle positivo no teste do cometa (SILVA; FERREIRA; SOUZA, 2003).

Algumas lectinas de planta são sabidamente genotóxicas, como é o caso da abrina (de *Abrus precatorius*), que se mostrou altamente tóxica ao DNA em culturas de linfócitos transformados pelo vírus Epstein Barr (BENNETT *et al.*, 1982). Usando o teste do cometa, foi demonstrado que ConA e ConBr produziram taxas de dano ao

DNA acima de 80% em células leucêmicas humanas (FAHEINA-MARTINS *et al.*, 2012). Estudo analisando a segurança da utilização de *M. oleifera* para o tratamento de água mostrou que o extrato das sementes, na concentração popularmente utilizada (0,2 µg/µL), não apresenta mutagenicidade nos ensaios de Ames, Kado e DNA plasmidial (ROLIM *et al.*, 2011). Porém, doses 3, 4, 5 e 7,5 vezes maior que a corriqueiramente usada foram mutagênicas para cepas de *Salmonella*. No entanto, no mesmo estudo foi demonstrado que uma lectina floculante isolada das sementes (WSMoL), apresentada como alternativa no tratamento de água, não mostrou atividade genotóxica em nenhum dos ensaios realizados. *Mo-CBP<sub>4</sub>*, apesar de ser uma lectina, assim como a WSMoL, parece não afetar o material genético de células.

Os testes apresentados neste capítulo são ensaios preliminares para a continuação do estudo de *Mo-CBP<sub>4</sub>* como um potencial biofármaco. Apesar dos resultados aqui apresentados mostrarem que essa proteína pouco afetou o funcionamento normal de camundongos, ou mesmo de células, muitas outras análises, como alergenicidade, carcinogenicidade e toxicidade crônica são essenciais para assegurar que a utilização futura desta lectina não causará danos ao homem.

## 7. CONCLUSÃO

---

*Mo*-CBP<sub>4</sub> não afetou o comportamento e massa corpórea de camundongos quando administrada por via oral, em uma dose elevada (2000 mg/kg). Efeitos adversos também não foram encontrados quando *Mo*-CBP<sub>4</sub> foi administrada diariamente, por 28 dias, em doses de até 10 vezes a terapêutica. Além de estudos *in vivo*, avaliações *in vitro* utilizando diversas metodologias e linhagens de células saudáveis ou cancerígenas mostraram que *Mo*-CBP<sub>4</sub> não apresenta efeitos cito- e genotóxicos. Apesar de outros estudos serem necessários para confirmar a segurança de utilização de *Mo*-CBP<sub>4</sub>, o presente estudo já evidencia que não há indícios de toxicidade relevantes por parte desta lectina.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

Sabe-se que a proposta de utilizar uma nova molécula para fins terapêuticos em humanos requer atividades complexas e multidisciplinares que podem durar dezenas de anos até a sua devida liberação à população. O presente trabalho estudou os aspectos estruturais, farmacológicos e toxicológicos de uma proteína ligante à quitina de sementes de *Moringa oleifera*, *Mo-CBP<sub>4</sub>*, como uma continuação do trabalho realizado anteriormente em nosso grupo de pesquisa.

Os experimentos realizados estão descritos nos três últimos capítulos deste trabalho. No segundo capítulo, foram estudadas as características estruturais de *Mo-CBP<sub>4</sub>*. Inicialmente, o protocolo de purificação desta proteína foi reavaliado e modificado a fim de se obter um maior rendimento no final do processo. Estruturalmente, *Mo-CBP<sub>4</sub>* mostrou-se como uma proteína heterodimérica rica em resíduos de glutamina e aminoácidos básicos. Estudos espectroscópicos mostraram que se trata de uma proteína alfa-beta com alta estabilidade a variações de temperatura e pH. Aspectos da estrutura terciária devem ser objetos de futuros estudos para se ter uma relação estrutura-atividade melhor estabilidade, proporcionando um maior aproveitamento funcional desta proteína.

O terceiro capítulo abordou o potencial terapêutico de *Mo-CBP<sub>4</sub>* nos processos de inflamação e dor, visando principalmente a sua utilização por via oral. Os resultados indicaram que *Mo-CBP<sub>4</sub>* possui uma potente atividade anti-inflamatória dependente do seu sítio de interação a carboidrato e tal efeito está relacionado com a diminuição dos níveis de IL-1 $\beta$  e aumento dos níveis de IL-10 no sangue dos animais. A atividade analgésica desta proteína mostrou dependência da ação anti-inflamatória e nenhuma relação com um possível efeito sedativo. Proteínas terapêuticas geralmente não são administradas via oral devido a alta susceptibilidade destas a hidrólise por enzimas do trato digestório. Portanto, ser resistente a ação destas proteases é o grande diferencial de *Mo-CBP<sub>4</sub>* possibilitando a utilização desta proteína pela via menos invasiva que é a via oral. Aspectos farmacodinâmicos e farmacocinéticos devem ser estudados para considerar uma futura utilização desta proteína como um fármaco.

E, finalmente, no quarto capítulo foram iniciados os estudos para avaliar a segurança da utilização de *Mo-CBP<sub>4</sub>*, seguindo protocolos de ensaios não-clínicos usados mundialmente para avaliar a toxicidade de novas entidades químicas. Ensaios

de toxicidade aguda de dose única e doses repetidas via oral, mostraram que os animais tratados com essa proteína não apresentaram mortalidade e nem sinais de toxicidade. Ensaio *in vitro*, utilizando cultura de células também mostraram que *Mo-CBP<sub>4</sub>* não afetou o funcionamento normal destas.

Portanto, *Mo-CBP<sub>4</sub>* apresenta-se como forte candidata a um futuro agente terapêutico contra os processos de inflamação e dor, pois atrelado a esta molécula está sua alta estabilidade estrutural, uma potente atividade por uma desejada via de administração para qualquer fármaco e uma alta segurança na sua utilização.

## REFERÊNCIAS

AGRAWAL, A.; MEHTA, A. Antiasthmatic activity of *Moringa oleifera* Lam: A clinical study. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 40, p. 28-31, 2008.

ALENCAR, N. M. N. *et al* An anti-inflammatory lectin from *Luetzelburgia auriculata* seeds inhibits adhesion and rolling of leukocytes and modulates histamine and PGE<sub>2</sub> action in acute inflammation models. **Inflammation Research**, v. 59, p. 245-254, 2010.

ALENCAR, N. M. N. *et al*. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediators of Inflammation**, v. 8, p. 107-113, 1999.

ALENCAR, N. M. N. *et al*. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces *in vivo* neutrophil migration by indirect mechanism. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 35, p. 1674-1681, 2003.

ALENCAR, N. M. N. *et al*. *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotactic mediators. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 374, p. 275-282, 2007.

ALENCAR, N. M. N. *et al*. *Vatairea macrocarpa* lectin induces paw edema with leukocyte infiltration. **Protein and Peptide Letters**, v. 11, p. 195-200, 2004.

ALENCAR, V. B. M. *et al*. *Helianthus tuberosus* agglutinin directly induces neutrophil migration, which can be modulated/inhibited by resident mast cells. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 83, p. 659-666, 2005c.

ALENCAR, V. B. M. *et al*. Lectin of *Pisum arvense* seeds induces *in vivo* and *in vitro* neutrophil migration. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, p. 375-381, 2005b.

ALENCAR, V. B. M. *et al*. Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, p. 1805-1814, 2005a.

AMAGLO, N. K. *et al.*, Profiling selected phytochemical and nutrients in different tissues of the multi-purpose tree *Moringa oleifera* L., grown in Ghana. **Food Chemistry**, v. 122, p. 1047–1054, 2010.

AMARAL, J. F. *et al*. Antinociceptive Effect of the Monoterpene R-(+)-Limonene in Mice. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 1217-1220, 2007.

AMAYA, D.R. *et al*. Moringa: hortaliça arbórea rica em beta-caroteno. **Horticultura Brasileira**, v.10, p.126, 1992.

ARA, N.; RASHID, M.; AMRAN, S. Comparison of *Moringa oleifera* leaves extract with atenolol on serum triglyceride, serum cholesterol, blood glucose, heart weight, body weight in adrenaline induced rats. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 15, p.

253-258, 2008.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, v. 2, p. 205-235, 1973.

ASENSIO, J. L. *et al.* Structural basis for chitin recognition by defense proteins: GlcNAc residues are bound in a multivalent fashion by extended binding sites in hevein domains. **Chemical Biology**, v. 7, p. 529–543, 2000.

ASHLEY *et al.* Inflammation: mechanisms, costs and natural variation. **Annual Reviews of Ecology Evolution and Systematics**, v. 43, p. 385-406, 2012.

ASLAM, M. *et al.* Mineral composition of *Moringa oleifera* leaves and pods from different regions of Punjab, Pakistan. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 4, p. 417–421, 2005.

ASSREUY, A. M. S. *et al.* Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans **Mediators of Inflammation**, v. 6, p. 201-210, 1997.

ASSREUY, A. M. S. *et al.* Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans **Mediators of Inflammation**, v. 6, p. 201-210, 1997.

BACH, M. K.; BRASHLER, J.R. Inhibition of IgE and compound 48/80-induced histamine release by lectins. **Immunology**, v. 29, p. 371–386, 1975.

BARON, R. Peripheral neuropathic pain: from mechanisms to symptoms. **Clinical Journal of Pain**, v.16, p.12-20, 2000.

BARRAL-NETTO, M. *et al.* Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the *Diocleae* tribe. **Immunological Investigations**, v. 21, p. 297-303, 1992.

BASBAUM, A.; JESSELL, T. The perception of pain. In: KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Principles of neural science**. 4<sup>a</sup> ed. New York: MacGraw-Hill, 2000. p. 472-491.

BATISTA, A. B. Caracterização estrutural e modo de ação contra fungos da Mo-CBP<sub>3</sub>, uma proteína ligante à quitina de sementes de *Moringa oleifera* Lamarck. **Tese (Doutorado em Bioquímica)** – Universidade Federal do Ceará, 2013.

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

BAUMANN, A. Early development of therapeutic biologics – pharmacokinetics. **Current Drug Metabolism**, v. 7, p. 15–21, 2006.

BAUMANN, A. Foundation review: Nonclinical development of biopharmaceuticals. **Drug Discovery Today**, v. 14, p. 1112-1122, 2009.

BEEH, K. M.; BEIER, J.; MEYER, M.; BUHL, R.; ZAHLTEN, R.; WOLFF, G. Bimosiamose, an inhaled small-molecule pan-selectin antagonist, attenuates late asthmatic reactions following allergen challenge in mild asthmatics: a randomized,

double-blind, placebo-controlled clinical cross-over-trial. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics**, v. 19, p. 233–241, 2006.

BENNETT, C. E.; GLASSMAN, A. B.; WITTEN, M. DNA and protein synthesis in normal and transformed lymphocytes exposed to abrin. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 16, p.185-188, 1982.

BENNETT, R. N. *et al.* Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose trees *Moringa oleifera* L. and *Moringa stenopetala* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3546-3553, 2003.

BENTO, C. A .M. *et al.* Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. **Inflammation Research**, v. 38, p. 48-54, 1993.

BERETTA, G; ZUNINO, F. Molecular mechanisms of anthracycline activity. **Topics in Current Chemistry**, v. 283, p. 1-19, 2008.

BERGER, M. R. *et al.* Toxicological assessment of seeds from *Moringa oleifera* and *Moringa stenopetala*, two highly efficient primary coagulants for domestic water treatment of tropical raw waters. **East African Medical Journal**, v. 61, p. 712-716, 1984.

BERKOVICH, L. *et al.* *Moringa oleifera* aqueous leaf extract down-regulates nuclear factor-kappa B and increases cytotoxic effect of chemotherapy in pancreatic cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 1-7, 2013.

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

BIES, C.; LEHR, C. M.; WOODLEY, J. F. Lectin-mediated drug targeting: history and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 425–35, 2004.

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

BOMBINI, G. *et al.* Tumor necrosis factor- $\alpha$  mediates neutrophil migration to the knee synovial cavity during immune inflammation. **European Journal of Pharmacology**, v. 496, p. 197–204, 2004.

BONICA, J.J. Anatomic and physiologic basis of nociception and pain. In: BONICA, J. J. **Management of Pain**. 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990.

BORMANN, C. *et al.* Characterization of a novel, antifungal, chitin-binding protein from *Streptomyces tendae* Tu901 that interferes with growth polarity. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 7421–7429, 1999.

BOUCKAERT, J. *et al.* Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the *Escherichia coli* Fim H adhesion. **Molecular Microbiology**, v. 55, p. 441–455, 2005.

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

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

BROEKAERT, W. F.; ALLEN, A. K.; PEUMANS, W. J. Separation and partial characterization of isolectins with different subunit compositions from *Datura stramonium* seeds. **FEBS Letters**, v. 220, p. 116–120, 1987.

BROEKAERT, W. F. *et al.* Antimicrobial peptides from *Amaranthus caudatus* seeds with sequence homology to the cysteine/glycine-rich domain of chitin-binding proteins. **Biochemistry**, v. 31, p. 4308-4314, 1992.

BROIN, M. *et al.* Flocculent activity of a recombinant protein from *Moringa oleifera* Lam. seeds. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 114–119, 2002.

CÁCERES A. *et al.* Pharmacological properties of *Moringa oleifera*. 2: screening for antispasmodic, antiinflammatory and diuretic activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36(3), p. 233-237, 1992.

CALDER, P. C. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: new twists in an old tale. **Biochimie**, v. 91, p. 791-795, 2009.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 20, p. 1515–1539, 2002.

CAVADA, B. S. *et al.* Glucose-mannose-binding lectins isolated from Brazilian beans stimulate the autophosphorylation of the insulin receptor *in vitro*. **Hormone and Metabolic Research**, v. 35, p. 125-127, 2003.

CHOLERIS, E. *et al.* A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, p. 235-260, 2001.

CHOUDHARY, M. K.; BODAKHE, S. H.; GUPTA, S. K. Assessment of the Antiulcer Potential of *Moringa oleifera* Root-Bark Extract in Rats. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, v. 6, p. 214-220, 2013.

CHUANG, P. H. *et al.* Antifungal activity of crude extracts and essential oils of *Moringa oleifera* Lam. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 232-236, 2007.

CHUMARK, P. *et al.* The *in vitro* and *ex vivo* antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 439-446, 2008.

CHUMARK, P. *et al.* The in vitro and ex vivo antioxidant properties, hypolipidaemic and antiatherosclerotic activities of water extract of *Moringa oleifera* Lam. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 439-446, 2008.

COELHO, M. B. *et al.* Neutrophil migration in mice induced by a mannose-binding lectin isolated from *Annona coriacea* seeds. **Toxicon**, v. 48, p. 529-535, 2006.

COELHO, R. C. Análise toxicológica e avaliação da estabilidade de uma proteína ligante à quitina isolada de sementes de *Moringa oleifera* como perspectiva de sua utilização como um biofármaco. **Monografia (Bacharelado em Biologia)** - Universidade Federal do Ceará, 2012.

COOK-MILLS, J. M.; DEEM, T. L. Active participation of endothelial cells in inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 77, p. 487-495, 2005.

COUTAUX, A. *et al.* Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72, p. 359-371, 2005.

CROMMELIN, D. J. *et al.* Shifting paradigms: biopharmaceuticals versus low molecular weight drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 266, p. 3-16, 2003.

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

CUNHA, F. Q. *et al.* Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **British Journal of Pharmacology**, v.104, p.765-767, 1991.

CUNHA, J. M. *et al.* Cytokine mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, p. 1418-1424, 2000.

CUNHA, T. M. *et al.* A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p. 1755-1760, 2005.

CUNHA, T. M. *et al.* An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n. 3, p. 401-407, 2004.

CUNHA, T. M. *et al.* Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, p. 824-832, 2008.

CYSNE, J. R. B. Propagação *in vitro* de *Moringa oleifera* L. **Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)** - Universidade Federal do Ceará, 2006.

DAI, Y. *et al.* Antipruritic and antinociceptive effects of *Chenopodium album* L. In Mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 245-250, 2002.

DASTUR, J. F. **Medicinal plants of Indian and Pakistan**. D. B. Taraporevala and Co: Delphi, p. 113-114, 1977.

DAUER, A. *et al.* Genotoxic and antigenotoxic effects of catechin and tannins from the bark of *Hamamelis virginiana* L. in metabolically competent, human hepatoma cells (HeG2) using single-cell gel electrophoresis. **Phytochemistry**, v. 63, p. 199-207, 2003.

DE MEIJER, V. E. *et al.* Repetitive orogastric gavage affects the phenotype of diet-induced obese mice. **Physiology & Behavior**, v. 100, p. 387-393, 2010.

DINARELLO, C. A. Anti-inflammatory agents: present and future. **Cell**, v. 140, p. 935–950, 2010.

DOHERTY, N. S. *et al.* Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. **Prostaglandins**, v. 30, p. 769-89, 1985.

DOURSOUT, M. F.; LIANG, Y.; CHELLY, J. E. NOS inhibitors exhibit antinociceptive properties in the rat formalin test. **Canadian Journal of Anesthesia**, v. 50, p. 909-916, 2003.

DRAY, A.; BEVAN, S. Inflammation and hyperalgesia: highlighting the team effort. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 14, p. 287-290, 1993.

ETZIONI, A. *et al.* Of man and mouse: leukocyte and endothelial adhesion molecule deficiencies. **Blood**, v. 94, p. 3281–3288, 1999.

EZEAMUZLE, I. C. *et al.* Anti-inflammatory effects of *Moringa oleifera* root extract, **International Journal of Pharmacognosy**, v. 34, p. 207-212, 1996.

FAHEINA-MARTINS, G. V. *et al.* Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. **Toxicology in Vitro**, v. 26, p. 1161-1169, 2012.

FAHEY, J. W. *Moringa oleifera*: A Review of the Medical Evidence for Its Nutritional, Therapeutic, and Prophylactic Properties. Part 1. **Trees for Life Journal**, v. 1(5), 2005.

FAIZI, S. *et al.* Fully acetylated carbamate and hypotensive thiocarbamate glycosides from *Moringa oleifera*. **Phytochemistry**, v. 38, p. 957- 963, 1995.

FAKURAZI, S.; ITHININ, H.; GAUDAR, U.N.L. *Moringa oleifera* Lam, prevents acetaminophen induced liver injury through restoration of glutathione level. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2611-2615, 2008.

FALTAS, B. S. M. Papyrus surgery. **Student BMJ**, v. 12, p. 338-339, 2004.

FARIAS, D. F. Biossegurança alimentar de proteínas Cry: dos métodos clássicos à era ômica. **Tese (Doutorado em Bioquímica)** – Universidade Federal do Ceará, 2013.

FARQUHAR-SMITH, W. P. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v.9, p.3-7, 2007.

FELDMANN, M.; PUSEY, C. D. Is there a role for TNF-alpha in antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis? Lessons from other chronic inflammatory diseases. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 17, p. 1243–1252, 2006.

FERREIRA, P. M. *et al.* Larvicidal activity of the water extract of *Moringa oleifera* seeds against *Aedes aegypti* and its toxicity upon laboratory animals. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, p. 207-216, 2009.

FERREIRA, P. M. P. *et al.* *Moringa oleifera*: bioactive compounds and nutritional potential. **Revista de Nutrição**, v. 21, p. 431-437, 2008.

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

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, p. 1227-1231, 1993.

FERREIRA, S. H.; NAKAMURA, M. I. Prostaglandin hyperalgesia, a cAMP/Ca<sup>2+</sup> dependent process. **Prostaglandins**, v.18, p.179-190, 1979.

FIGUEIREDO J. G. *et al.* Pharmacological analysis of the neutrophil migration induced by *Dioclea rostrata* lectin: Involvement of cytokines and nitric oxide. **Toxicon**, v. 54, p. 736-744, 2009.

FOIDL, N.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER K. The potential of *Moringa oleifera* for agricultural and industrial uses. In: **The Miracle Tree/ The Multiple Attributes of Moringa**, Ed. Lowell J Fuglie, CTA. USA, 2001.

FOLEY, J. F. Focus issue: understanding mechanisms of inflammation. **Science Signaling**, v. 6, p. 1-3, 2013.

FORTES, Z. B.; HYSLOP, S.; DENUCCI, G. Endothelial-derived vascular relaxing factors: role of nitric oxide. In: BRAIN, S. D.; PAGE, C. (Eds.), **Immunopharmacology of Microcirculation**, Academic Press, New York, p. 16-42, 1994.

FRANCIS, J. A.; JAYAPRAKASAM, B.; OLSON, L. K.; NAIR, M. G. Insulin secretagogues from *Moringa oleifera* with cyclooxygenase enzyme and lipid peroxidation inhibitory activities. **Helvetica Chimica Acta**, v. 87, p. 317-326, 2004.

FREIRE, J. E. C. Análise *in silico* da sequência deduzida de Mo-CBP<sub>3</sub>, uma proteína ligante à quitina de *Moringa oleifera* Lam. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica)** - Universidade Federal do Ceará, 2013.

FREIRE, M. G. M. *et al.* Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds. **Toxicon**, v. 42, p. 275-280, 2003.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, v. 18, p. 499-502, 1972.

FUGLIE, L. J. The Miracle Tree: *Moringa oleifera*: Natural Nutrition for the Tropics. Dakar: Church World Service, 1999.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**, v.48, p.129-141, 1999.

GAIDAMASHVILI, A; VAN STADEN, J. Prostaglandin inhibitory activity by lectin-like proteins from South African medicinal plants. **South African Journal of Botany**, v. 72, p. 661-663, 2006.

MORINGA OLEIFERA, M. I; DAMASCENO, L. F; BRITO, E.S. Avaliação química e estrutural da semente de moringa. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37(1), p.106-109, 2006.

GASSENSCHMIDT, U. *et al.* Isolation and characterization of a flocculating protein from *Moringa oleifera* Lam. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1243, p. 477-481, 1995.

GAUTAM, R.; JACHAK, S. M. Recent developments in anti-inflammatory natural products. **Medicinal Research Reviews**, v. 29, p. 767–820, 2009.

GHAZARIAN, H. *et al.* A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics. **Acta Histochemica**, v. 113, p. 236–247, 2011.

GHEBREMICHAEL K. A. *et al.*, Simple purification and activity assay of the coagulant protein from *Moringa oleifera* seed. **Water Resources Research**, v. 39, p. 2338–2344, 2005.

GIFONI, J. M.; OLIVEIRA, J. T. A.; OLIVEIRA, H. D.; BATISTA, A. B.; PEREIRA, M. L.; GOMES, A. S.; OLIVEIRA, H. P.; GRANGEIRO, T. B.; VASCONCELOS, I. M. A novel chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seed with potential for plant disease control. **Peptide Science**, v. 98, p. 406-415, 2012.

GIKNIS, M. L. A.; CLIFFORD, C. B. Clinical Laboratory Parameter for Crl:WI (Han), 2008. Disponível em: [http://www.criver.com/files/pdfs/rms/wistarhan/rm\\_rm\\_r\\_wistar\\_han\\_clin\\_lab\\_parameters\\_08.aspx](http://www.criver.com/files/pdfs/rms/wistarhan/rm_rm_r_wistar_han_clin_lab_parameters_08.aspx). Acessado em 03/10/2013.

GILANI, A. H. *et al.* Pharmacological studies on hypotensive and spasmolytic activities of purê compounds from *Moringa oleifera*. **Phytotherapy Research**, v. 8, p. 87-91, 1994.

GILANI, A. H. *et al.* Pharmacological studies on hypotensive and spasmolytic activities of pure compounds from *Moringa oleifera*. **Phytotherapy Research**, v. 8, p. 87-91, 1994.

GOMES, J. C. *et al.* Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans: comparison with concanavalin A. **Inflammation Research**, v. 41, p. 132-135, 1994.

GOOLCHARRAN, C.; KHOSRAVI, M.; BORCHARDT, R. T. **Chemical pathways of peptide and protein degradation**, in: S. Frokjaer, L. Hovgaard (Eds.), *Pharmaceutical Formulation: Development of Peptides and Proteins*, London: Taylor&Francis, 2000, 70–88 p.

GORELIK, E.; GALILI, U.; RAZ, A. On the role of cell surface carbohydrates and their binding proteins (lectins) in tumor metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 20, p. 245–277, 2001.

GOWRISHANKAR, R. *et al.* Trace element studies on *Tinospora cordifolia* (Menispermaceae), *Ocimum sanctum* (Lamiaceae), *Moringa oleifera* (Moringaceae), and *Phyllanthus niruri* (Euphorbiaceae) using PIXE. **Biological Trace Element Research**, v. 133, p. 357–363, 2010.

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

Grant, G. *et al.* Nutritional and haemagglutination properties of several tropical seeds. **Journal of Agricultural Science**, v. 124, p. 437-445, 1995.

GRANT, G. **Lectins**. In: D'MELLO, J. P. F., Duffus, C.M. (Eds.), *Toxic Substances in Crop Plants*, Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1991. 49–67 p.

GRANT, G., **Plant lectins**. In: CAYGILL, J. C., MUELLER-HARVEY, I. (Eds.), *Secondary Plant Products: Antinutritional and Beneficial Actions in Animal Feeding*, Nottingham: Nottingham University Press, 1999. 87–110 p.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **Nature Protocols**, v. 1, p. 2876-2890, 2006.

GUERRERO, A. T. *et al.* Involvement of LTB<sub>4</sub> in zymosan-induced joint nociception in mice: participation of neutrophils and PGE<sub>2</sub>. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, p. 122-130, 2008.

GUPTA, R. *et al.* Evaluation of antidiabetic and antioxidant activity of *Moringa oleifera* in experimental diabetes. **Journal of Diabetes**, v. 4, p. 164-171, 2012.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiología médica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

HALTER, F.; TARNAWSKI, A. S.; SCHMASSMANN, A.; PESKAR, B. M. Cyclooxygenase-2 implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing; controversial issues and perspectives. **Gut**, v. 49, p. 443–453, 2001.

HAMZA, A. A. Ameliorative effects of *Moringa oleifera* Lam seed extract on liver fibrosis in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 345–355, 2010.

HANDWERKER, H. O. Influences of algogenic substances and prostaglandins on the discharges of unmyelinated cutaneous nerve fibers identified as nociceptors. In: BONICA, J. J.; ALBE-FESSARD, D. (Ed.). **Advances in Pain Research and Therapy**. New York: Raven Press, 1976. v.1, p.41-45.

HART, C. A. *et al.* Lectin-induced damage to the enterocyte brush border. An electron-microscopic study in rabbits. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 23, p. 1153-1159, 1988.

HIGGS, G. A.; MONCADA, S.; VANE, J. R. Eicosanoids in inflammation. **Annals of Clinical Research**, v. 16, p. 287–299. 1984.

HOSTANSKA, K. *et al.* A plant lectin derived from *Viscum album* induces cytokine gene expression and protein production in cultures of human peripheral blood mononuclear cells. **Nature Immunology**, v. 14, p. 295–304, 1995.

HUKKERI, V. I. *et al.* Antipyretic and wound healing activities of *Moringa oleifera* lam. in rats. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 68, p. 124-126, 2006.

HUNSKAAR, A. T.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-104, 1987.

HUNT, S. P.; MANTYH, P. The molecular dynamics of pain control. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 2, p. 83-91, 2001.

HUTTENLOCHER, A.; SANDBORG, R. R.; HORWITZ, A. F. Adhesion in cell migration. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 7, p. 697-706, 1995.

IMPELLIZZERI, D.; CUZZOCREA, S. Targeting selectins for the treatment of inflammatory diseases. **Expert Opin Ther Targets**, v. 18, p. 55-67, 2014

JACHAK, S. M.; SAKLANI, A. Challenges and opportunities in drug discovery from plants. **Current Science**, v. 92, p. 1251–1257, 2007.

JAHN S. A. A.; MUSNAD H.A.; BURGSTALLER H. The tree that purifies water. Cultivating multipurpose Moringaceae in the Sudan. **Unasyiva**, v. 38, p. 23-28, 1986.

JAHN, S. A. A. Using Moringa seeds as coagulants in developing countries. **Journal of the American Water Works Association**, v. 80, p. 45-50, 1988.

JAIN, M; JOHNSON, T. S.; KRISHNAN, P. Biotechnological approaches to conserve the wealth of nature: endangered and rare medicinal plant species, a review. **Journal of Natural Remedies**, v. 12, p. 93-102, 2012.

JAIN, P. G. *et al.* Hypolipidemic activity of *Moringa oleifera* Lam., Moringaceae, on high fat diet induced hyperlipidemia in albino rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, p. 969–973, 2010.

JAISWAL, D. *et al.* Effect of *Moringa oleifera* Lam. leaves aqueous extract therapy on hyperglycemic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 392-396, 2009.

JAISWAL, D. *et al.* Role of *Moringa oleifera* in regulation of diabetes-induced oxidative stress. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, p. 426-432, 2013.

JANEWAY, C. A. *et al.* **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease**, 6 ed. New York: Garland Science, 2005.

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

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

KATRE, U. V. *et al.* Structure-activity relationship of a hemagglutinin from *Moringa oleifera* seeds, **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 42, p. 203-207, 2008.

KELSALL, A. *et al.* Dietary lectins can stimulate pancreatic growth in the rat. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 83, p. 203-208, 2002.

KHASAR, S. G. *et al.* A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. **Neuron**, v. 24, p. 253-260, 1999.

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

KNOWLES, R. G. Development of anti-inflammatory drugs – the research and Development process. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 114, p. 7-12, 2014.

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

LARSEN, G. L.; HENSON, P. M. Mediators of inflammation. **Annual Review of Immunology**, v. 1, p. 335-359, 1983.

LAVICH, T. R. *et al.* Neutrophil infiltration is implicated in the sustained thermal hyperalgesic response evoked by allergen provocation in actively sensitized rats. **Pain**, v. 125, p. 180–187, 2006.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 597–652, 2001.

LEADER, B.; BACA, Q.J.; GOLAN, D.E. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, p. 21-39, 2008.

LEMOS, H. P. *et al.* Prostaglandin mediate IL-23/IL-17-induced neutrophils migration in inflammation by inhibiting IL-12 INF-gama production. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 5954-5959, 2009.

LEVINE, J. D. *et al.* Leukotriene B4 produces hyperalgesia that is dependent on polymorphonuclear leukocytes. **Science**, v. 225, p. 743–745, 1984.

LEVINE, J. D. *et al.* The role of the polymorphonuclear leukocyte in hyperalgesia. **Journal of Neuroscience**, v. 5, p. 3025–3029, 1985.

LIMA, R. F. *et al.* Red marine alga *Bryothamnion triquetrum* lectin induces endothelium-dependent relaxation of the rat aorta via release of nitric oxide. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 1415-1421, 2004.

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

LIU, B. *et al.* Antiproliferative activity and apoptosis-inducing mechanism of Concanavalin A on human melanoma A375 cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 482, p. 1–6, 2009.

LIU, B.; BIAN, H.J.; BAO, J.K. Plant lectins: Potential antineoplastic drugs from bench to clinic. **Cancer Letters**, v. 287, p. 1-12, 2010.

LIU, B.; MIN, M. W.; BAO, J. K. Induction of apoptosis by concanavalin A and its molecular mechanisms in cancer cells. **Autophagy**, v. 5 , p. 432–433, 2009.

LIU, Z. *et al.* Could plant lectins become promising anti-tumour drugs for causing autophagic cell death? **Cell Proliferation**, v. 46, p. 509–515, 2013.

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

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 347, 2002.

LORIA, V. *et al.* Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. **Mediators of Inflammation**, v. 2008, p. 1-4, 2008.

LOWE, J. B. Glycan-dependent leukocyte adhesion and recruitment in inflammation. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, p. 531–538, 2003.

LUZ, L. A. *et al.* Structural characterization of coagulant *Moringa oleifera* Lectin and its effect on hemostatic parameters. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 31-36, 2013.

LUZ, P. B. Fração proteica isolada do látex de *Calotropis procera* (ait.) R. Br reduz hipernocicepção inflamatória mecânica em camundongos: mecanismos e mediadores envolvidos. **Dissertação (Mestrado em Farmacologia)** – Universidade Federal do Ceará, 2012.

LYU, S. Y.; CHOI, S. H.; PARK, W. B. Korean mistletoe lectin-induced apoptosis in hepatocarcinoma cells is associated with inhibition of telomerase via mitochondrial controlled pathway independent of p53. **Archives of Pharmacal Research**, v. 25, p. 93–101, 2002.

MACIEL, E. V. *et al.* Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. **Biologicals**, v. 32, p. 57-60, 2004.

MAHAJAN, S. G.; MEHTA, A. A. Immunosuppressive activity of ethanolic extract of seeds of *Moringa oleifera* Lam. In experimental immune inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 183–186, 2010.

MAHAJAN, S.G., MALI, R.G; MEHTA, A.A. Inhibitory Action of Ethanolic Extract of Seeds of *Moringa oleifera* Lam. On Systemic and Local Anaphylaxis. **Journal of Immunotoxicology**, v. 4, p. 287-294, 2007b.

MAHAJAN, S. G., MALI, R. G; MEHTA, A. A. Protective Effect of Ethanolic Extract of Seeds of *Moringa oleifera* Lam. Against Inflammation Associated with Development of Arthritis in Rats. **Journal of Immunotoxicology**, v. 4, p. 39-47, 2007a.

MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Nutrients and antiquality factors in different morphological parts of the *Moringa oleifera* tree. **Journal of Agricultural Science, Cambridge**, v. 128, p.331- 322, 1997.

MAKONNEN, E.; HUNDE, A.; DAMECHA, G. Hypoglycaemic effect of *Moringa stenopetala* aqueous extract in rabbits. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 147-148, 1997.

MANAHEJI, H. *et al.* Analgesic effects of methanolic extracts of the leaf or root of *Moringa oleifera* on complete Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. **Journal of Chinese Integrative Medicine**, v. 9, p. 216-222, 2011.

MANGURO, L. O.; LEMMEN, P. Phenolics of *Moringa oleifera* leaves. **Natural Product Research**, v. 21, p. 56-68, 2007.

MANNING, M. C.; PATEL, K.; BORCHARDT, R. T. Stability of protein pharmaceuticals. **Pharmaceutical Research**, v. 6, p. 903–918, 1989.

MARCHAND, S. The physiology of pain mechanism: from the peripheral to the brain. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v.34, p.285-309, 2008.

MATOS, F. J. A. **Farmácias vivas: sistema de utilização de plantas medicinais projetados para pequenas comunidades**. 3. ed. Fortaleza: EUFC, 1998. 220 p.

MATSUDA, K. *et al.* *Datura stramonium* agglutinin released histamine from rat peritoneal mast cells that was inhibited by pertussis toxin, haptenic sugar and N-acetylglucosamine specific lectins: Involvement of glycoproteins with N-acetylglucosamine residues. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 66, p. 195–204, 1994.

MAYHAN, W. G. Role of nitric oxide in modulating permeability of hamster cheeks pouch in response to adenosine 5-diphosphate and bradykinin. **Inflammation**, v. 16, p. 295-305, 1992.

MBIKAY, M. Therapeutic Potential of *Moringa oleifera* Leaves in Chronic Hyperglycemia and Dyslipidemia: A Review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 3, p. 24, 2012.

MCCONNELL, E. L.; BASIT, A. W.; MURDAN, S. Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, p. 63-70, 2008.

MCINNES, I. B.; SCHETT G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **New England Journal of Medicine**, v. 365, p. 2205-2219, 2011.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-435, 2008.

MEHTA, L.K. *et al.* Effect of fruits of *Moringa oleifera* on the lipid profile of normal and hypercholesterolaemic rabbits. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86(2-3), p. 191-5, 2003.

MENEZES, R. A. Neuroanatomofisiologia da Dor. In: MENEZES, R. A. (Org.). **Síndromes Dolorosas: diagnóstico-terapêutico – saúde física e mental**. Rio de Janeiro: Revinter, 1999. p.9-19.

MEYER, R. A.; CAMPBELL, F. N.; RAJA, S. N. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: WALL, P. D.; MELZACK, R. **Textbook of pain**. 3 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1994. 13-44 p.

MINKO T. Drug targeting to the colon with lectins and neoglycoconjugates. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 491–509, 2004.

MISLOVIČOVÁ, D. *et al.* Lectinomics I. Relevance of exogenous plant lectins in biomedical diagnostics. **Biologia**, v. 64, p. 1-19, 2009.

MODY, R.; JOSH, S.; CHANEY, W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 33, p. 1–10, 1995.

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

MONTENEGRO, M. R., FRANCO, M. **Patologia processos gerais**. 5 ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2010, 233 p.

MORTON J. F. The horseradish tree, *Moringa pterygosperma* (Moringaceae): a boon to arid lands? **Journal of Economic Botany**, v. 45(3), p. 318-333, 1991.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOTA, M. R. L. *et al.* Modulation of acute inflammation by a chitin-binding lectin from *Araucaria angustifolia* seeds via mast cells. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 374, p. 1-10, 2006.

MUANGNOI C, *et al.* *Moringa oleifera* pod inhibits inflammatory mediator production by lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 murine macrophage cell lines. **Inflammation**, v. 35, p. 445-55, 2012.

MUGHAL, M. H. S.; SRIVASTAVA, P. S.; IQBAL, M. Drumstick (*Moringa pterygosperma* Gaertn.): a unique source of food and medicine. **Journal of Economic and Taxonomic Botany**, v. 23, p. 47-61, 1999.

MUKHERJEE, D. Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors and potential risk of cardiovascular events. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, p. 817-821, 2002.

MURAKAMI, A. *et al.* Niaziminin, a thio carbamate from the leaves of *Moringa oleifera*, holds a strict structural requirement for inhibition of tumor promotor-induced Epstein-Barr virus activation, **Planta Medica**, v. 64, p. 319-323, 1998.

MURDOCK, L. L.; SHADE, R. E. Lectins and protease inhibitors as plant defense against insects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6605-6611, 2002.

NAISBETT, B.; WOODLEY, J. The potential use of tomato lectin for oral drug delivery: I. Lectin binding to rat small intestine in vitro. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 107, p. 223-230, 1994.

NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H.; A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **European Journal of Pharmacology**, v. 135, p. 145-153, 1987.

NAPIMOGA, M.H. *et al.* *Lonchocarpus sericeus* lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokine and chemokines production. **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 824-35, 2007.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 173-182, 2006.

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

NATHAN, C.; DING, A. Non-resolving inflammation. **Cell**, v. 140, p. 871-882, 2010.

NDABIGENGESERE, A.; NARASIAH, S. K.; TALBOT, B.G. Active agents and mechanism of coagulation of turbid waters using *Moringa oleifera*. **Water Research**, v. 29, p. 703-710, 1996.

NÉMETH, T.; MÓCSAI, A. The role of neutrophils in autoimmune diseases. **Immunology Letters**, v. 143, p. 9–19, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311–335, 2012.

NOBACK, C. R. *et al.* Pain and temperature. In: NOBACK, C.R.; STROMINGER, N. L.; DAMAREST, R.J.; RUGGIERO, D. A. **The human nervous system: structure and function**. 5<sup>th</sup> ed. New York: Williamns & Wilkins, 1996. cap. 9, p.155-175.

NUNES, B.S. *et al.* Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 379, p. 609-16, 2009.

OLIVEIRA, J. T. A. *et al.* *Canavalia brasiliensis* seeds. Protein quality and nutritional implications of dietary lectin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 64, p. 417–424, 1994.

OPAL, S. M.; DEPALO, V. A. Anti-Inflammatory Cytokines. **Impact of Basic Research on Tomorrow's Medicine**, v. 117, p. 1162–1172, 2000.

ORGANISATION ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 423. **Acute Oral Toxicity-Acute Toxicity Class Method**. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2001. Disponível em: [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-zethod\\_9789264071001-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-zethod_9789264071001-en). Acesso em 25 de abril de 2012.

ORGANISATION ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD 407. **Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents**. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris, 2008. Disponível em: [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-407-repeated-dose-28-day-oral-toxicity-study-in-rodents\\_9789264070684-en;jsessionid=5hjch2eipm23p.delta](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-407-repeated-dose-28-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070684-en;jsessionid=5hjch2eipm23p.delta). Acesso em 25 de abril de 2012.

PAL, S. K.; MUKHERJEE, P. K.; SAHA, B. P. Studies on the Antiulcer Activity of *Moringa oleifera* Leaf Extract on Gastric Ulcer Models in Rats. **Phytotherapy Research**, PTR 9.6, p. 463,1995.

PALANISAMY, V.; KUMARESAN, K., Studies on seed development and maturation in annual *Moringa*. **Vegetable Science**, v. 12, p. 74-78, 1985.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v. 327, p. 524-526, 1987.

PANDA, S. *et al.* Cardioprotective potential of N,<alpha>-L-rhamnopyranosyl vincosamide, an indole alkaloid, isolated from the leaves of *Moringa oleifera* in isoproterenol induced cardiotoxic rats: In vivo and in vitro studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 959-962, 2013.

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

PANTOJA-UCEDA, D. *et al.* Solution structure of allergenic 2S albumins. **Plant Food Allergens**, v. 30, p. 919-924, 2002.

PEREIRA, M. L. *et al.* Purification of a chitin-binding protein from *Moringa oleifera* seeds with potential to relieve pain and inflammation. **Protein & Peptide Letters**, v. 18, p. 1078-1085, 2011.

PEREIRA, M. L. Identificação de Uma Proteína Ligante à Quitina em Sementes de *Moringa oleifera* Lamarck com Atividades Antinociceptiva e Anti-inflamatória. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica)** – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

PEUMANS, W. J. *et al.* Isolation of a novel plant lectin with an unusual specificity from *Calystegia sepium*. **Glycoconjugate Journal**, v. 14, p. 259–265, 1997.

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

PIRES, A. F. *et al.* Opioid-like antinociceptive effects of oral administration of a lectin purified from the seeds of *Canavalia brasiliensis*. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 27, p. 201–209, 2011.

PLATTNER, V. E. *et al.* Targeted drug delivery: binding and uptake of plant lectins using human 5637 bladder cancer cells. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, p. 572–576, 2008.

PUSZTAI, A. *et al.* Kidney bean lectin-induced *Escherichia coli* overgrowth in the small-intestine is blocked by GNA, a mannose-specific lectin. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, p. 360–368, 1993.

PUSZTAI, A. **General effects on animal cells.** In: PUSZTAI, A., (Ed.), *Plant Lectins*, Cambridge: Cambridge University Press, 1991. 105–205 p.

PUSZTAI, A., *et al.* Effects of an orally administered mistletoe (type-2 RIP) lectin on growth, body composition, small intestinal structure, and insulin levels in young rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 9, p. 31–36, 1998.

PUSZTAI, A.; BARDOCZ, S.; EWEN, S.W. Uses of plant lectins in bioscience and biomedicine. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 1130–1140, 2008.

RABINOVICH, G. A. *et al.* An emerging role for galectins in tuning the immune response: lessons from experimental models of inflammatory disease, autoimmunity and cancer. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, p. 143-158, 2007.

RAIKHEL, N. V.; LEE, H. I. Structure and function of chitin-binding proteins. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 44, p. 591–615, 1993.

RAMACHANDRAN C., PETER K. V., GOPALAKRISHNAN P.K. Drumstick (*Moringa oleifera*): a multipurpose Indian vegetable. **Journal of Economic Botany**, v.34(3) p. 276-283, 1980.

RAMOS, S. J. *et al.* Produção de matéria seca e óleo essencial de menta sob diferentes doses de fósforo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 9-12, 2005.

RATANAPO, S.; NGAMJUNYAPORN, W.; CHULAVATNATOL, M. Sialic acid binding lectins from leaf of mulberry (*Morus alba*). **Plant Science**, v. 139, p. 141–148, 1998.

RIBEIRO, R. A. *et al.* IL-8 cause in vivo neutrophil migration by cell dependent mechanism. **Immunology**, v. 73, p. 472-477, 1991.

RIBEIRO, R. A. *et al.* Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymozan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, p. 111-118, 2000a.

RIBEIRO, R. A. *et al.* Analgesic effect of thalidomide on inflammatory pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 391, p. 97–103, 2000b.

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

ROCHA, B. A. M. *et al.* Structural basis for both pro- and anti-inflammatory response induced by mannose-specific legume lectin from *Cymbosema roseum*. **Biochimie**, v. 93, p. 806-816, 2011.

ROGERIO, A. P. *et al.* Anti-asthmatic potential of a D-galactosebinding lectin from *Synadenium carinatum* latex. **Glycobiology**, v. 17, p. 795–804, 2007.

ROLIM, L. *et al.* Genotoxicity evaluation of *Moringa oleifera* seed extract and lectin. **Journal of Food Science**, v. 76, p. 53-58, 2011.

ROSSITER, H.; ALON, R.; KUPPER, T. S. Selectins, T-cell rolling and inflammation. **Molecular Medicine Today**, v. 3, p. 214-222, 1997.

RUCKMANI, K. *et al.* Effect of *Moringa oleifera* Lam on paracetamol-induced hepatotoxicity. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, p. 33-35, 1998.

RYAN, G. B.; MAJNO, G. Acute inflammation. **American Journal of Pathology**, v. 86, p.185-276, 1977.

SALTER, M. W. Cellular signaling pathways of spinal pain neuroplasticity as target for analgesic development. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.5, p.1-11, 2005.

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

SANTOS, A. F. S. *et al.* Isolation of a seed coagulant *Moringa oleifera* lectin. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 504-508, 2009.

SASHIDHARA, K. V. *et al.* Rare dipeptide and urea derivatives from roots of *Moringa oleifera* as potential anti-inflammatory and antinociceptive agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 432-436, 2009.

SATTAUR, O. The light of the village. **New Scientist**, v. 100, p. 830-831, 1983.

SCHELLEKENS, H. Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, p. 457-462, 2002.

SCHIMMER, B. P.; PARKER, K. L. **Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs; Inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones.** In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. 10 ed. USA: McGraw; 2001, 1649–1677 p.

SCHMIDT, B. *et al.* A natural history of botanical therapeutics. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 57, p. S3–S9, 2008.

SCHUMACHER, K. *et al.* Influence of postoperative complementary treatment with lectin-standardized mistletoe extract on breast cancer patients. A controlled epidemiological multicentric retrolective cohort study. **Anticancer Research**, v. 23, p. 5081-5087, 2003.

SCHWARZ, R. E. *et al.* Wheat germ agglutinin-mediated toxicity in pancreatic cancer cells. **British Journal of Cancer**, v. 80, p. 1754-1762, 1999.

SCRIVO, R. *et al.* Inflammation as "common soil" of the multifactorial diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 10, p. 369-374, 2011.

SHARMA, V. *et al.* Antinociceptive activity of hydro ethanol extract from *Moringa oleifera* (Moringaceae) pods in Swiss albino mice. **Internationale pharmaceutica scientia**, v. 2, p. 54-61, 2012.

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

SILVA, A. R.; KERR, W. E. **Moringa: uma nova hortaliça para o Brasil**. Uberlândia: UFU/DIRIU, 1999, 95 p.

SILVA, H. C. *et al.* Purification and primary structure of a mannose/glucose-binding lectin from *Parkia biglobosa* Jacq. seeds with antinociceptive and anti-inflammatory properties. **Journal of Molecular Recognition**, v. 26, p. 470–478, 2013.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na  $\beta$ -lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, p. 407-416, 2003.

SMEETS, R. L. *et al.* Soluble interleukin-1 receptor accessory protein ameliorates collagen-induced arthritis by a different mode of action from that of interleukin-1 receptor antagonist. **Arthritis & Rheumatology**, v. 52, p. 2202–2211, 2005.

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

SOUTO, F. O. *et al.* Quercetin reduces neutrophil recruitment induced by CXCL8, LTB<sub>4</sub>, and fMLP: inhibition of actin polymerization. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 113-118, 2011.

SOUZA, G. E. *et al.* Neutrophil migration induced by inflammatory stimuli is reduced by macrophage depletion. **Agents Actions**, v. 24, p. 377-380, 1988.

SREELATHA, S.; JEYACHITRA, A.; PADMA, P. R. Antiproliferation and induction of apoptosis by *Moringa oleifera* leaf extract on human cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1270–1275, 2011.

SREERAMA, N. E.; WOODY, R. W. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. **Analytical Biochemistry**, v. 287, p. 252-260, 2000.

STAUB, A. *et al.* Intact protein analysis in the biopharmaceutical field. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, p. 810-822, 2011.

STROHL, W. R.; KNIGHT, D. M.; Discovery and development of biopharmaceuticals: current issues. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 668-672, 2009.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Analytical Method Validation: Back to Basics, Part 1. **LCGC North America**, v. 27, p. 11-15, 2009

SULAIMAN, M. R. *et al.* Evaluation of *Moringa oleifera* Aqueous Extract for Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities in Animal Models. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, p. 838-845, 2008.

SÜLEYMAN H, DEMIRCAN B, KARAGÖZ Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacological Reports*, v. 59, p. 247-258, 2007.

SUZUKI, K. *et al.* Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. **Analytical Biochemistry**, v. 132, p. 345-352, 1983.

TABAS, I.; GLASS, C. K. Anti-Inflammatory Therapy in Chronic Disease: Challenges and Opportunities. **Science**, v. 339, p. 166-172, 2013.

TJOLSEN, A. *et al.* The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 5–17, 1992.

TJOLSEN, A.; HOLE, K. **Animal models of analgesia**. In *The Pharmacology of Pain*; Besson, M.J., Deckson, A., Eds.; Berlin: Springer-Verlag, 1997. 21–41 p.

TRINDADE, M. B. *et al.* Structural characterization of novel chitin-binding lectins from the genus *Artocarpus* and their antifungal activity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1764, p. 146-152, 2006.

TURNBACH, M. E.; RANDICH, A. The role of spinal neurokinin-1 and glutamate receptors in hyperalgesia and allodynia induced by prostaglandin E(2) or zymosan in the rat. **Pain**, v. 97, p. 127-137, 2002.

TURNBULL, A. V.; RIVIER, C. L. Regulation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. **Physiological Reviews**, v. 79, p. 1–71, 1999.

UNITED NATIONS WORLD FOOD PROGRAMME. Interactive Hunger Map. Disponível em: <[www.wfp.org/country\\_brief/unger\\_map/map/hungermap\\_popup/map\\_popup.html](http://www.wfp.org/country_brief/unger_map/map/hungermap_popup/map_popup.html)> Acesso em 13 Fev, 2010.

VALENTINER, U. *et al.* The influence of dietary lectins on the cell proliferation of human breast cancer cell lines in vitro. **Anticancer Research**, v. 23, p. 1197–1206, 2003.

VAN DAMME, E. J. M. *et al.* Characterization and molecular cloning of two different type 2 ribosome-inactivating proteins from the monocotyledonous plant *Polygonatum multiflorum*. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 2746–2759, 2000.

VAN DAMME, E. J. M. *et al.* Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological role. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, p. 575–692, 1998.

VANDERAH, T.W. Pathophysiology of pain. **Medical Clinics of North America**, v. 91, p.1-12, 2007.

VANDERLEI, E. S. O. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. **International Immunopharmacology**, v. 10, p. 1113–1118, 2010.

VASCONCELOS, I. M., *et al.* Nutritional study of two Brazilian soybean (*Glycine max*) cultivars differing in the contents of antinutritional and toxic proteins. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, p. 1-8, 2001.

VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, v. 44, p. 385-403, 2004.

VERRI JUNIOR, W. A. *et al.* Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, p. 116-138, 2006.

VESTWEBER, D.; BLANKS, J. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. **Physiological Reviews**, v. 79, p. 181-213, 1999.

WADHWA, S., *et al.* A review on commercial, traditional uses, phytoconstituents and pharmacological activity of *Moringa oleifera*. **Global Journal of Traditional Medicinal Systems**, v. 2, p. 1-13, 2013.

WALL, P. D.; MELZACK, R. **Textbook of pain**. 4 ed. London: Churchill Livingstone, 1999.

WALSH, G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. **Nature Biotechnology**, v 28, p. 917–924, 2010.

WILLIAMS, L. L. *Moringa oleifera*: Could this be an Answer to our Need for an Alternative to Fighting Drug-Resistance and Chronic Infections? **Medicinal & Aromatic Plants**, v. 2, p. 1-3, 2013.

WOODY, R. W. Aromatic side-chain contributions to far ultraviolet circular dichroism of peptides and proteins. **Biopolymers**, v. 17, p. 451-1467, 1978.

ZALATNAI, A. *et al.* Wheat germ extract inhibits experimental colon carcinogenesis in F-344 rats. **Carcinogenesis**, v. 22, p. 1649–1652, 2001.

ZHANG, L.; HSU, C. H.; ROBINSON, C. P. Effects of ricin administration to rabbits on the ability of their coronary arteries to contract and relax in vitro. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 129, p. 16-22, 1994.

ZHANG, N. *et al.* Investigation of lectin-modified insulin liposomes as carriers for oral administration. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 294, p. 247–259, 2005.