

**Universidade Federal do Ceará**  
**Centro de Ciências**  
**Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular**  
**Mestrado em Bioquímica**

**JOZI GODOY FIGUEIREDO**

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELA LECTINA DE SEMENTES DE *Dioclea*  
*rostrata* Benth: MECANISMOS E MEDIADORES ENVOLVIDOS**

**Orientador: Prof. Dr. BENILDO SOUSA CAVADA**  
**Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> NYLANE MARIA NUNES DE ALENCAR**

**FORTALEZA**  
**2007**

JOZI GODOY FIGUEIREDO

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELA LECTINA DE SEMENTES DE *Dioclea rostrata* Benth: MECANISMOS E MEDIADORES ENVOLVIDOS**

Dissertação apresentada à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

**Orientador: Prof. Dr. BENILDO SOUSA CAVADA**  
**Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> NYLANE MARIA NUNES DE ALENCAR**

**Fortaleza**  
**2007**

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

---

- F49r Figueiredo, Jozi Godoy.  
Resposta inflamatória induzida pela lectina de sementes de *Dioclea rostrata*: mecanismos e mediadores envolvidos / Jozi Godoy Figueiredo. – 2007.  
92 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2007.  
Orientação: Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada.
1. Lectina de sementes. 2. Inflamação. 3. *Dioclea rostrata*. 4. Citocinas. 5. Migração de Neutrófilos. I. Título.

CDD 572

---

JOZI GODOY FIGUEIREDO

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELA LECTINA DE SEMENTES DE *Dioclea rostrata* Benth: MECANISMOS E MEDIADORES ENVOLVIDOS**

Dissertação apresentada à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Aprovada em 09/03/2007

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar (Co-Orientador)  
Universidade Federal do Ceará–UFC

---

Profa. Dra. Ana Maria Sampaio Assreuy  
Universidade Estadual do Ceará–UECE

**A minha mãe Santa Figueiredo uma grande mulher. Talvez a maior e melhor de todas que eu conheci. Sonhou mais alto que eu sonhei, lutou em minhas próprias batalhas, e chorou por mim quando minhas lutas pareciam não caminhar aos nossos sonhos.**

**Ao meu pai, sempre presente em meu coração e pensamento.**

**Dedico.**

***“Se enxerguei mais longe, foi  
porque me apoiei sobre os  
ombros de gigantes”  
–Issac Newton.***

## AGRADECIMENTOS

Devo confessar que os “agradecimentos” são de alguma forma sempre cruéis, ou por que faltam as palavras para expressar a gratidão que sentimos, ou por que faltam alguns nomes, que talvez pelo cansaço deixamos de recordar. Enfim, o espaço parece pequeno, o tempo escasso e o desejo de terminar inevitável, mas aqui começo:

A Deus, por ter me dado a oportunidade de realizar meus sonhos num mundo onde poucos podem, me iluminando nos momentos difíceis e fazendo ultrapassar os obstáculos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Benildo Sousa Cavada pela oportunidade de me acolher em seu grupo de pesquisa e sua contribuição para minha formação científica, sugestões e críticas neste trabalho.

A minha co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nylane Maria Nunes de Alencar pelo carinho, interesse e dedicação constantes durante a orientação desse trabalho, pela amizade sincera e contribuição direta no meu crescimento como profissional e pessoal. A admiração que tenho por você não se pode expressar nessas poucas linhas e você sabe disso.

Ao Prof. Dr. Fernando Cunha, pela gentileza de receber-me em seu laboratório, contribuindo com este trabalho.

Ao Prof. Marcus Raimundo Vale por contribuir na minha formação científica sempre com idéias criativas e construtivas.

A Prof<sup>a</sup>. Ana Maria Assreuy, que aceitou o convite para participar desta banca.

Vou dedicar um parágrafo especial ao amigo, colega de laboratório e conterrâneo Flávio da Silveira Bitencourt, que incansavelmente sempre esteve ao meu lado desde o começo desta jornada em Fortaleza me ajudando dentro e fora do laboratório, fazendo por vezes sua família a minha família. Sua contribuição foi muito importante neste trabalho e nossa amizade ficará guardada para sempre.

Aos meus colegas Mário Mota, Ingrid Figueiredo, que juntamente com o Flávio formamos um quarteto fantástico, posso dizer que por vezes eram mais que amigos e pareciam como irmãos que me ancoravam nos momentos difíceis e me encorajavam a prosseguir.

As minhas amigas e colegas de laboratório Priscila, Cínthia, Carla, Taiana, Cibele, pela amizade e renúncia aos seus outros compromissos para me ajudar nos experimentos, fortes guerreiras agüentaram firmes no decorrer deste tempo.

Aos meninos Michael, Rodney, Ítalo e Jonatan e Cid, pela sua companhia sempre agradável. A Patrícia, técnica do laboratório de Bioquímica da Farmacologia meu muito obrigado por sua contribuição para este trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, principalmente aqueles responsáveis pelo trabalho árduo, mas gratificante, de isolar e purificar as lectinas.

Aos colegas do BioMolab que me receberam com grande carinho: Kyria (em especial), Bruno, Luciana, Emmanuel Prata, Taianá, Victor, Gustavo, Rodrigo, Raquel, Ramón, Liazinha, Ana Julia, Lara, Márcia, Eduardo, Welves, Tales, Felipe, Jonatham, e Rafael.

Ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia onde realizei a maior parte experimental deste trabalho. De forma especial aos funcionários do Biotério, Aroldo e Edmilson pela inestimável ajuda com os animais que foram utilizados neste trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Inflamação e Dor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. Dani Secco, Fernando, Fabrício, Andreza, Renata, Beth, Dioneia, Henrique, Sandra, Zeca, Maria, Silvio. As técnicas Giuliana Bertozi, Kátia Santos, Diva, Ieda e Serginho pela contribuição durante minha estada, o profissionalismo de vocês engrandece este departamento.

Ao coordenador do curso de Pós-Graduação em Bioquímica Professor Joaquim Albenísio Gomes da Silveira pela colaboração ao longo do curso.

As Professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica pelos seus ensinamentos ao longo das disciplinas, em especial ao funcionário Márcio que sempre me socorreu nos meus intermináveis questionamentos.

Aos colegas do curso de Pós-Graduação em Bioquímica Neuza, Luana, Ramon, Denise, Franklin, Walderly, Emmanuel, João Garcia, Sandra, Luciana,

Luciano, Saulo, David, Ed Carlos. Pelos nossos momentos de intenso estudo em que vocês compartilharam seus conhecimentos comigo.

A minha mãe Santa Figueiredo pela sua incansável busca pelo meu sucesso, tenho certeza que meu sucesso futuro será fruto de seu investimento no passado e apoio no presente; ao meu pai João Sidenei Figueiredo (*in memorian*) que embora ausente tem sua grande contribuição em minha formação; ao meu irmão Marcelo e minha cunhada Márcia pela torcida a distância.

Ao meu noivo; nossa história começou na faculdade e a partir de então você acompanhou todos os momentos, os bons e os ruins. Quanto não teve de escutar sobre os planejamentos que não davam certo, as angústias, o nervosismo, mas também a alegria dos bons resultados. Obrigado pelo apoio, incentivo, companheirismo e por tudo que vivemos apesar da distância.

As amigas Sara e Milena pelo carinho concedido e pela presença ao meu lado durante esta jornada e pelas agradáveis conversas nas horas de caminhada.

A todos meus amigos do sul que me ligavam, escreviam e me mandavam apoio das formas mais inusitadas; em particular ao meu amigo Jozé Marcos, Renato e minha amiga Patrícia.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho a minha gratidão. Meu muito obrigado!

### **Este Trabalho foi Realizado com o Auxílio das Seguintes Instituições:**

- Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pela concessão da bolsa de estudo como apoio financeiro ao desenvolvimento científico.
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelos convênios estabelecidos ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos financiamentos aos Projetos do Laboratório.
- Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.
- Laboratório de Farmacologia e Bioquímica do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará.
- Laboratório de Inflamação e Dor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
- À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará.

# ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	13
LISTA DE TABELAS .....	14
LISTA DE ABREVIATURAS.....	15
RESUMO.....	16
ABSTRACT .....	17
1. INTRODUÇÃO .....	18
1.1. Lectinas .....	18
1.1.2. Classificação.....	21
1.2. Efeitos Biológicos .....	22
1.3. Lectinas vegetais.....	24
1.3.1. Lectinas de <i>Dioclea rostrata</i> .....	25
2- RESPOSTA INFLAMATÓRIA .....	27
2.1. Migração de Leucócitos.....	31
2.2. Células envolvidas na inflamação .....	33
2.2.2. Macrófagos .....	33
2.2.3. Mastócitos.....	34
2.3. Mediadores envolvidos no processo inflamatório.....	35
2.3.1. Óxido Nítrico .....	35
2.3.2. Citocinas .....	37
2.3.3. Quimiocinas .....	40
3. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS .....	42
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1. Animais.....	44
4.2. Lectinas .....	44
4.3. Drogas e Reagentes .....	44
4.4. Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais .....	46
5. MODELOS EXPERIMENTAIS .....	48
5.1. Avaliação da atividade pró-inflamatória da lectina de <i>Dioclea rostrata</i> .....	48
5.1.1. Modelo de peritonite .....	48
5.1.2. Curso Temporal da Migração de Leucócitos para cavidade peritoneal induzida pela lectina de <i>Dioclea rostrata</i> . .....	49
5.1.3. Investigação do envolvimento do domínio lectínico na atividade pró-inflamatória da lectina de <i>Dioclea rostrata</i> . .....	49

5.1.4. Efeito da desnaturação térmica da lectina sobre a migração de neutrófilos induzida por lectina de <i>Dioclea rostrata</i> .....	49
5.1.5. Modulação farmacológica da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida pela lectina de <i>Dioclea rostrata</i> .....	50
5.2. Mudanças na população de células residentes da cavidade peritoneal .....	50
5.2.1. Pré-tratamento com tioglicolato: incremento da população de macrófagos residentes na cavidade peritoneal .....	50
5.2.2. Pré-tratamento com o composto 48/80: depleção de mastócitos peritoneais .....	51
5.3. Bolsa de ar subcutânea (“Air pouch”) .....	51
5.4. Cultura de células: Macrófagos peritoneais.....	52
5.4.1. Dosagem de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-10.....	53
5.5. Modelo de edema de pata.....	54
5.5.1. Atividade da Mieloperoxidase (MPO) nas patas dos animais.....	54
5.6. Quimiotaxia de neutrófilos <i>in vitro</i> .....	55
5.7. Análise Estatística .....	55
6. RESULTADOS .....	56
6.1. No modelo de peritonite em ratos a lectina de <i>Dioclea rostrata</i> induz migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de forma dose-e tempo-dependente.....	56
6.2. $\alpha$ -metil-D-manosídeo inibe a atividade pró-inflamatória da Dros.....	58
6.3. Desnaturação térmica reverte o efeito pró-inflamatório da lectina de <i>Dioclea rostrata</i> .....	58
6.4. Indometacina, Talidomida e Dexametasona inibem a migração de neutrófilos induzida pela Dros.....	58
6.5. Mudanças da população de células peritoneais residentes alteram a atividade pró-inflamatória da lectina de <i>Dioclea rostrata</i> .....	63
6.5.1. A migração de neutrófilos induzida pela lectina de <i>Dioclea rostrata</i> foi potenciada pelo aumento da população de macrófagos residentes em ratos. ....	63
6.5.2. A depleção da população de mastócitos não altera a migração de neutrófilos induzida pela lectina de <i>Dioclea rostrata</i> em ratos. ....	63
6.6. Macrófagos estimulados com Dros <i>in vitro</i> , liberam substância quimiotática para neutrófilos.....	66
6.6.1. Lectina de <i>Dioclea rostrata</i> induz liberação de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-10 para o sobrenadante da cultura de macrófagos .....	66

6.7. No modelo de bolsa de ar subcutânea (“Air pouch”) a lectina de <i>Dioclea rostrata</i> induz migração de neutrófilos.....	66
6.8. Lectina de <i>Dioclea rostrata</i> induz efeito edematogênico .....	69
6.8.1. O edema de pata induzido pela lectina de <i>Dioclea rostrata</i> , apresenta infiltração de neutrófilos .....	70
6.5. Lectina de <i>Dioclea rostrata</i> induz quimiotaxia de neutrófilos in vitro de forma dose-dependente. ....	73
7. DISCUSSÃO .....	75
8. CONCLUSÃO.....	81
9.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS: .....	82

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sementes de <i>Dioclea rostrata</i> .....	26
Figura 2. Diagrama da resposta inflamatória.....	28
Figura 3. Interação entre leucócitos e a célula endotelial durante alteração vascular. .....	32
Figura 4. Lectina de Dros induz migração de neutrófilos de forma dose- e tempo dependente. ....	57
Figura 5. Bloqueio do domínio lectínico da Dros com $\alpha$ -metil-D-manosídeo inibe o seu efeito pró-inflamatório na cavidade peritoneal. ....	60
Figura 6. Desnaturação térmica reverte o efeito pró-inflamatório da lectina de Dros. .....	61
Figura 7. O aumento da população de macrófagos na cavidade peritoneal potencia a migração de neutrófilos induzida pela Dros. ....	64
Figura 8. A depleção de mastócitos da cavidade peritoneal não altera a migração de neutrófilos induzida pela Dros. ....	65
Figura 9. O sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados com a lectina de Dros induz migração de neutrófilos. ....	67
Figura 10. Lectina de Dros aumenta níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-10 em sobrenadante da cultura de macrófagos. ....	68
Figura 11. A lectina de Dros induz migração de neutrófilos no modelo de bolsa de ar subcutânea.....	69
Figura 12. Lectina de Dros induz edema de pata.....	71
Figura 13. Lectina de Dros aumenta a atividade da MPO na pata dos animais.....	72
Figura 14. Lectina de Dros induz quimiotaxia de neutrófilos in vitro.....	74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Cronograma dos principais eventos envolvendo lectinas.....	20
Tabela 2. Efeito de diferentes bloqueadores farmacológicos na migração de neutrófilos induzida por lectina de <i>Dioclea rostrata</i> na cavidade peritoneal. ....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AA - Ácido Araquidônico  
AE - Azul de Evans  
ANOVA - Análise da Variância  
ASC - Área sob a curva  
C3a - Terceiro fator do sistema complemento  
C5a - Quinto fator do sistema complemento  
Da- Daltons  
Dros- Lectina de *Dioclea rostrata*  
E.P.M - Erro padrão da média  
EDRFs- Fatores de relaxamento derivados do endotélio  
fMLP- N-formil-metil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina  
i.p - Intraperitoneal  
IgE- Imunoglobulina E  
IL-1- Interleucina 1  
IL-2- Interleucina 2  
IL-10- Interleucina 10  
IL-13- Interleucina 14  
IFN- $\gamma$ - interferon gama  
KDa - Kilodaltons  
LPS - Lipopolissacarídeos  
MAN – manose  
MIF – Fator inibidor de macrófagos  
MN – Migração de neutrófilos  
MPO- Mieloperoxidase  
NK – Células natural killer  
NO - Óxido nítrico  
NOS – óxido nítrico sintase  
PAF - Fator de agregação de plaquetas  
PCA- Proteína C ativada  
PGE - Prostaglandina da série E  
PGI - Prostaglandina da série I (prostacilinas)  
PMNs – Neutrófilos polimorfonucleares  
RIPs - Proteínas inativadoras de ribossomos  
s.c – Sub-cutânea

## RESUMO

Resposta inflamatória induzida pela lectina de sementes de *Dioclea rostrata* Benth: mecanismos e mediadores envolvidos. JOZI GODOY FIGUEIREDO. Dissertação apresentada à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Data da defesa: 09 de março de 2007. Orientador: Benildo Sousa Cavada.

Lectinas são proteínas que através de ligações a resíduos de carboidratos podem interagir com sistemas biológicos elicitando uma diversidade de efeitos. As lectinas vegetais têm sido utilizadas como ferramentas no estudo da inflamação devido a sua capacidade de reconhecer resíduos de carboidratos presentes nas membranas das células inflamatórias através de seus domínios lectínicos. Assim, investigou-se neste trabalho o possível efeito pró-inflamatório da lectina de sementes de *Dioclea rostrata*; ligadora de  $\alpha$ -metil-D-manosídeo sobre a migração de neutrófilos (MN) [(*in vivo* e *in vitro*)]. Os modelos utilizados foram: peritonite, edema de pata e bolsa de ar subcutânea (*in vivo*), quimiotaxia de neutrófilos e cultura de macrófagos (*in vitro*). Foi verificado que a lectina apresentava atividade pró-inflamatória em todos os estudos realizados. O aumento do número de macrófagos através do pré-tratamento dos animais com tioglicolato potencializou a MN induzida por Dros; a depleção de mastócitos através do tratamento com o composto 48/80 não interferiu na MN da lectina. Sendo assim sugeriu-se o envolvimento de macrófagos e desconsiderou-se o de mastócitos. Na modulação farmacológica no modelo de peritonite feita através do pré-tratamento dos animais com drogas anti-inflamatórias, observou-se que indometacina, dexametasona e talidomida inibiram a MN. A lectina induziu quimiotaxia *in vitro*, estimulou a síntese/liberação de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1, IL-10, desta maneira sugere-se que estudos mais detalhados sejam realizados em continuidades a este trabalho para verificar se esta lectina pode ser utilizada em modelos de imunossupressão.

O  $\alpha$ -metil-D-manosídeo reverteu a MN induzida por Dros, desta forma parece que a Dros desencadeia resposta inflamatória através da interação de seus domínios lectínicos com açúcares presentes na membrana de macrófagos.

## ABSTRACT

Lectins are proteins possessing a carbohydrate moiety that are able to interact with biological systems eliciting a variety of effects. Vegetal lectins have been used as tools in the study of inflammation due to its ability to recognize carbohydrate residues in inflammatory cell membranes by means of its lectin domain. The present work studied the pro-inflammatory effects of the lectin from *Dioclea rostrata* seeds (Dros), a binder of  $\alpha$ -methyl-D-mannoside, on neutrophil migration (NM) [(*in vivo* and *in vitro*)]. The models of peritonitis, paw edema, and subcutaneous air pouch (*in vivo*), neutrophil chemotaxis and macrophage culture (*in vitro*) were utilized. It was found that Dros showed a pro-inflammatory activity in all of the above models. The increase in the number of macrophages by the pre-treatment of the animals with thioglycolate potentiated the Dros-induced NM. Also, the depletion of mast cells by the use of the substance 48/80 did not interfere in the lectin-induced NM. The above data suggest the involvement of macrophages but not mast cells in the mechanisms studied. The pre-treatment of the peritoneum with anti-inflammatory drugs like indomethacin, dexamethasone and thalidomide inhibited the NM. Dros induced chemotaxis *in vitro* and stimulated the synthesis / release of cytokines as TNF- $\alpha$  and IL-1 in addition to IL-10 and this way he/she suggests himself that more detailed studies are accomplished in continuities to this work to verify this lectin can be used in immunosuppression models.

In the paw edema model the lectin promoted an intense edema and a significant increase in the myeloperoxidase activity (when compared to the control group).

The  $\alpha$ -methyl-D-mannoside reversed the Dros-induced NM and so it seems that Dros triggers the inflammatory response by means of the interaction of its lectin domain with sugars in the macrophage membrane. The present data suggest that Dros could be used as tools in biochemical and pharmacological studies.

## 1. INTRODUÇÃO

O progresso da ciência e tecnologia, avança no sentido do entendimento de novos mecanismos e suas conseqüências e isto tem levado à novas técnicas e metodologias. Plantas e moléculas vegetais ainda permanecem como principais fontes de drogas utilizadas para estudos farmacológicos. Compostos identificados em diferentes tecidos e órgãos vegetais são freqüentemente responsáveis pelo crescente desenvolvimento da medicina moderna. (MORALE *et al.*, 1998).

Grandes avanços na bioquímica e biologia molecular envolvem estudos sobre lectinas, pois estes abrangem as mais diversas áreas do conhecimento científico, uma vez que estas biomoléculas possuem um gama de aplicabilidades.

### 1.1. Lectinas

De acordo com Peumans e seus colaboradores (1995) as lectinas são proteínas capazes de reconhecer e ligar-se de forma específica e reversível a açúcares estando eles na forma de mono ou oligossacarídeos. Esta característica confere eventualmente as lectinas à capacidade de aglutinarem células e precipitarem polissacarídeos ou glicoproteínas. Algumas lectinas, por serem monovalentes (apresentam um único sítio de ligação a carboidratos), podem também apresentar um ou mais sítios que não ligam carboidratos, mas expressam outra atividade biológica.

A primeira demonstração científica de lectinas foi feita em 1888 por Stillmark, quando em seu trabalho experimental de doutorado demonstrou que o extrato de sementes de *Ricinus communis* L. possuía a habilidade de aglutinar eritrócitos. Sendo denominadas como fitohemaglutininas as proteínas responsáveis por este efeito. Em 1954, Boyd & Sharpleigh sugeriram o termo lectina, do latim “legere” (habilidade de selecionar), devido à propriedade destas proteínas de aglutinarem eritrócitos humanos de um grupo específico (MOREIRA *et al.*, 1991).

Alguns anos depois, Sharon & Lis (1972) definiram o termo lectina como sendo proteínas aglutinadoras de células com especificidade de reconhecimento por carboidratos. Posteriormente Goldstein e seus colaboradores, (1980) expandiram este conceito, definindo lectinas como sendo proteínas/glicoproteínas de origem não

imune com especificidade de ligação a carboidratos, e capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados.

Segundo Singh *et al.*, (1999) a especificidade das lectinas é variável e está associada com a habilidade de interagir com acetilamino – carboidratos, amino – carboidratos, ácido siálico, hexoses, pentoses e muitos outros carboidratos, além de terem capacidade de precipitar polissacarídeos, glicoproteínas e glicolipídeos dotados de resíduos de açúcares específicos.

Nos últimos anos, o interesse pelo estudo das lectinas tem se intensificado devido principalmente, as evidências destas proteínas atuarem como mediadoras do reconhecimento celular numa grande variedade de sistemas biológicos. Um importante exemplo destes fenômenos consiste no desenvolvimento das lectinas no processo de adesão de vírus, bactérias e protozoários as células do hospedeiro e de leucócitos ao endotélio vascular, fato importantíssimo na resposta de defesa do organismo (revisado por SHARON & LIS, 1989).

A tabela 1 mostra o cronograma dos eventos importantes envolvendo o estudo das lectinas e suas principais aplicações, de acordo com SHARON & LIS (2003).

Ano	Cientistas	Eventos
1860	S. W. Mitchell	Atividade hemaglutinante em veneno de cascavel.
1888	P. H. Stillmark	Atividade hemaglutinante em extratos de <i>Ricinus communis</i>
1908	K. Landsteiner	Hemaglutininas de plantas espécies específicas
1919	J. B. Summer	Isolamento e cristalização da Concanavalina A (ConA)
1936	J. B. Summer & S. F. Howell	Especificidade por açúcar da ConA
1948/ 49	K. O. Renkonem	Especificidade de lectinas de plantas por diferentes grupos sanguíneos
1952	W. M. Watkins & W. T. J. Morgan	Uso de lectinas de plantas para o reconhecimento de açúcares de superfície celular
1954	W. C. Boyd & E. Shapley	Aglutininas específicas para antígenos sanguíneos
1960	P. C. Nowell	Atividade mitogênica da Fitohemaglutinina (PHA)
1963	J. C. Aub	Aglutinação de células cancerosas por WGA
1965	I. J. Goldstein	Purificação da ConA por afinidade e utilização para estudos estruturais de carboidratos
1970	J. Porath	Lectinas para purificação de glicoproteínas por afinidade
1972	G. M. Edelman; K. O. Hartman	Estrutura primária e 3-D da ConA
1974	G. Ashwell & A. Morell	Função de lectinas animais em endocitose de glicoproteínas
1976	Y. Reisner & N. Sharon	Uso de lectinas para fracionamento de linfócitos
1977	I. Ofek, D. Mirelman & N. Sharon	Funções de lectinas bacterianas nas doenças infecciosas
1981	Y. Reisner & N. Sharon	Uso de lectina de soja no transplante de medula
1983	E. C. Butcher & I. Weissman;	Lectinas e migração de linfócitos
1988	K. Drickamer	Identificação dos domínios de reconhecimento de carboidratos em lectinas animais
1989/ 2007	Vários autores	Considerável incremento no estudo de lectinas nas mais diversas áreas. Demonstração de diversas atividades biológicas e aplicabilidades

**Tabela 1. Cronograma dos principais eventos envolvendo lectinas.** Adaptado de SHARON & LIS (2003). LECTINS. Kluwer Academic Publishers, 1-454.

### 1.1.2. Classificação

À medida que novas descobertas foram sendo feitas em relação a estrutura e atividades das lectinas, ocorreram também algumas propostas de classificação. A mais aceita até o momento é a de Peumans e Van Damme, (1998), que baseados nas características estruturais e dos sítios de atividade biológica das lectinas, propuseram a classificação destas proteínas em quatro grandes grupos: Merolectinas, Hololectinas, Quimerolectinas e Superlectinas.

As Merolectinas consistem de um único domínio lectínico, sendo assim incapazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados; além disso, essas proteínas têm baixo peso molecular. Como exemplo deste grupo citam-se as lectinas de orquídeas e a heveína (VAN PARRIJS *et al.*, 1991).

As Hololectinas são proteínas que apresentam mais de um sítio de ligação para carboidratos, isto é, possuem no mínimo dois domínios lectínicos, os quais são idênticos ou homólogos. Devido a esta propriedade elas podem aglutinar células ou precipitar glicoconjugados, fato este que as tornam conhecidas como hemaglutininas. As lectinas de origem vegetal são as grandes representantes deste grupo.

As Quimerolectinas são lectinas que possuem um ou mais sítios de ligação a carboidratos, além de possuir outro sítio não lectínico com atividade biológica. Dependendo no número dos sítios de ligação a açúcares, as quimerolectinas se comportam como holo ou merolectinas, sendo o caso das proteínas inativadoras de ribossomos tipo 2 (RIPs – 2 – abrina e ricina).

As Superlectinas apresentam dois ou mais sítios lectínicos, porém com especificidades diferentes; as lectinas de tulipa ilustram bem esta classe.

As lectinas podem apresentar outros sítios ligantes específicos para moléculas de natureza não glicídica. Deste modo, o processo de reconhecimento celular deve ser seriamente avaliado, uma vez que esses sítios também podem estar participando do efeito final dessas proteínas (BARONDES, 1988).

## 1.2. Efeitos Biológicos

As lectinas são moléculas biologicamente ativas que estão entre as mais estudadas em todo mundo. A abundância em sementes, principalmente de leguminosas, a relativa facilidade de purificação de muitas dessas proteínas e sua solubilidade em soluções fisiológicas, são fatores que facilitam a aplicabilidade das lectinas nas mais diversas áreas do conhecimento científico (MOREIRA *et al.*, 1993).

As lectinas são instrumentos poderosos de decodificação dos glicocódigos utilizados na troca de informações entre as células. Desse modo, na medida em que as lectinas identificam estes glicocódigos nas superfícies celulares, elas desencadeiam uma série de fenômenos biológicos importantes “*in vivo*” ou “*in vitro*” (CALVETE *et al.*, 2003).

Estudos com lectinas têm demonstrado que, apesar de algumas destas proteínas apresentarem especificidade de ligação comum a carboidratos, a afinidade de cada proteína pelo mesmo ligante é, em alguns casos consideravelmente diferente, sugerindo que algum tipo de diferença estrutural entre as lectinas pode ocasionar diferenças de afinidade em cada complexo estabelecido entre lectina-ligante (CAVADA *et al.*, 2001).

Nos últimos anos, vários experimentos foram feitos e os resultados obtidos evidenciaram ainda mais a importância da interação proteína-carboidrato, que exerce um papel primordial no processo de adesividade do leucócito a células endoteliais. O potencial de lectinas como mediadoras na adesão de leucócitos ao endotélio vascular, foi inicialmente demonstrado por Stoolman & Rosen *et al.*, (1993), através da determinação de que açúcares monoméricos podiam inibir a ligação de linfócitos humanos ao endotélio vascular. Várias linhas de pesquisa foram conduzidas com a finalidade de utilizar as lectinas como ferramentas para o estudo da inflamação (ALENCAR *et al.*, 1999, 2003, 2004, 2005, ASSREUY *et al.* 1997, 1999; GADELHA *et al.*; 2006, MOTA *et al.*; 2006).

Entre as descobertas importantes com o estudo destas proteínas citam-se: atividade antitumoral por Andrade *et al.*, (2004) e indução de apoptose em células tumorais por lectinas vegetais por Hostanska *et al.*, (2003). Foi relatada a

fosforilação do receptor para insulina, induzida por lectinas vegetais glicose/manose específicas *in vitro* (CAVADA *et al.*, 2003).

Podem-se citar ainda a aglutinação celular, mitose, toxicidade e inibição do crescimento celular. Algumas lectinas têm mostrado induzir apoptose em vários tipos de células, o qual pode ajudar a explicar sua toxicidade (HASEGAWA *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2000).

Estudos com as lectinas da sub-tribo Diocleinae, mostraram que estas proteínas são capazes de provocar mitose em linfócitos humanos e induzir a produção de interferon- $\gamma$  (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992, MACIEL *et al.*, 2004). Além de estimular liberação de histamina por mastócitos peritoneais em ratos (GOMES *et al.*, 1994). Foi demonstrado também que a lectina de soja e das leguminosas *Dioclea grandiflora*, *Canavalia brasiliensis* e *Vaitarea macrocarpa* são capazes de induzir migração de leucócitos e formação de edema de pata em ratos (BENTO *et al.*, 1993; ALENCAR *et al.*, 2003, 2004; FREIRE *et al.*, 2003), o que vislumbra a melhora do tratamento de infecções, principalmente em pacientes imunossuprimidos. A produção de óxido nítrico *in vivo* e *in vitro* por células peritoneais murinas também tem sido relatada como atividade imunoestimulante (ANDRADE *et al.*, 1999), e a ativação de linfócitos e apoptose *in vivo* (BARBOSA *et al.*, 2001)

Nosso grupo demonstrou que, lectinas de leguminosas quando administradas endovenosamente, apresentam potente ação antiinflamatória, exercendo ações importantes na interação leucócito-endotélio, e provavelmente bloqueio do sítio de ligação para as selectinas endógenas (ASSREUY *et al.*, 1997, ALENCAR *et al.*, 2005). Além da inibição de eventos inflamatórios agudos, demonstrou-se ainda que estas lectinas previnem a lesão urotelial no modelo de cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida em camundongos (ASSREUY *et al.*, 1999). Em trabalho recente, foi esclarecido que o excelente potencial antiinflamatório da lectina de sementes de *Lonchocarpus sericeus*, anteriormente demonstrado por Alencar *et al.* 1999 e 2005, é em parte, devido a habilidade desta lectina a LSL em inibir o rolamento e adesão dos leucócitos no endotélio vascular (NAPIMOGA *et al.*, 2007).

### 1.3. Lectinas vegetais

As lectinas estão presentes em todas as classes e famílias de organismos, sendo encontradas em vegetais superiores, algas, fungos, animais (vertebrados e invertebrados), bactérias e vírus. Entretanto, é nos vegetais que tem sido identificado o maior número de lectinas, as quais podem apresentar especificidades por diferentes resíduos de açúcares, existindo assim: lectinas ligadoras de resíduos de N-acetil-glicosamina como as extraídas das espécies *Lonchocarpus sericeus*, *Triticum vulgare*, *Araucária angustifolia*, *Oryza sativa* e *Solanum tuberosum*; lectinas com especificidade por manose como as extraídas de sementes de *Andira surinamesis*; lectinas específicas por glicose/manose; e ainda aquelas específicas a resíduos de N-acetil-galactosamina, L-fucose e ácido siálico (MOREIRA *et al.*, 1991).

A maioria das lectinas vegetais é obtida de sementes, principalmente das leguminosas, onde são acumuladas no período de maturação e desaparecem após a germinação (LORIS, 2002). A família *Leguminosae* tem sido intensamente estudada e representam um grupo de proteínas similares estruturalmente, porém com diferentes especificidades a carboidratos. A subtribo *Diocleinae* (família *Leguminosae*) compreende 13 principais gêneros, sendo que algumas lectinas têm sido isoladas de plantas que pertencem a alguns destes gêneros: *Canavalia*, *Cratylia* e *Dioclea* (CAVADA *et al.*, 2001).

Lectinas de leguminosas, segundo Cavada *et al.*, (1993), normalmente são constituídas de duas ou quatro subunidades de 25 a 30 KDa, e a interação entre a proteína e o carboidrato se torna estável na presença de íons  $Ca^{++}$  e  $Mn^{++}$  ligados à cavidade hidrofóbica da lectina; além disso, essas possuem propriedades bioquímicas e físico-químicas semelhantes, apresentando um grau de homologia considerável entre suas seqüências de aminoácidos, apesar de possuírem diferenças na especificidades por carboidratos. Algumas lectinas de leguminosas são N-glicosiladas (IMBERTY *et al.*, 2000). Em adição ao sítio de carboidratos estas lectinas apresentam um sítio hidrofóbico que se liga especificamente a compostos não polares como adenina, ácido indol acético ou porfirinas (SHARON *et al.*, 2003).

Diversas lectinas de plantas já foram isoladas e caracterizadas em relação a sua estrutura molecular, propriedades bioquímicas e especificidade a carboidrato. Devido a diferenças nas características dessas lectinas, sugeriu-se tratar de um grupo muito heterogêneo de proteínas. Estudos mais detalhados permitiram traçar

relações evolutivas entre as lectinas de plantas conhecidas nos dias atuais, dividindo as lectinas vegetais em sete diferentes famílias: lectinas de leguminosas; lectinas de monocotiledôneas ligadoras de manose; lectinas ligadoras de quitina; lectinas RIPs tipo 2; lectinas semelhantes à jacalina; lectinas semelhantes à amarantina e lectinas de floema de curcubitácea (VAN DAMME *et al.*, 1998).

A ampla distribuição das lectinas em quase todas as famílias vegetais e a conservação de suas principais características pode sugerir que estas proteínas sejam essenciais para a sobrevivência das espécies (MOREIRA *et al.*, 1991).

Em vegetais, diversas proteínas que apresentam atividade de interação a carboidratos já foram identificadas, isoladas e caracterizadas, embora suas funções fisiológicas ainda estejam em curso de investigação. Entretanto algumas destas proteínas são capazes de interagir com fragmentos de oligossacarídeos oriundos de parede celular de fungos fitopatogênicos (PEUMANS *et al.*, 2000). Pouco é especulado sobre um papel sinalizador mediado pela interação de superfície celular (COLOMBO *et al.*, 2004). A função mais provável dessas lectinas nos vegetais é a defesa. Além disto, estas proteínas também estão envolvidas no reconhecimento de bactérias fixadoras de nitrogênio com o propósito de facilitar a formação de cordões de infecção, a subsequente nodulação e o estabelecimento de simbiose entre a planta e o microorganismo (YAMAMOTO *et al.*; 2001)

### **1.3.1. Lectinas de *Dioclea rostrata***

As sementes da *Dioclea rostrata* Benth foram coletadas no estado do Ceará, nordeste de Brasil mais precisamente na Chapada do Araripe, esta planta faz parte da família das leguminosas e pertencem a sub-tribu *Diocleinae*, não se tem relatos de seus usos populares.

A lectina de sementes de *Dioclea rostrata* (Dros), não apresenta carboidratos ligados covalentemente e possui uma composição rica em aminoácidos ácidos e hidroxilados, típica de lectinas leguminosas. A Dros mostrou uma identidade imunológica total e uma seqüência N-terminal de aminoácidos muito semelhante quando comparada com outras lectinas da mesma sub-tribu (CAVADA *et al.*, 1996).

Seu processo de isolamento e purificação consiste de uma única etapa realizada por cromatografia de afinidade em coluna de Sefadex G-50. A lectina, uma

metaloproteína que requer cátions divalentes para ligar resíduos de carboidratos, aglutina fortemente hemáceas de coelho e é inibida por glicose e manose (CAVADA *et al.*, 1996).

Segundo Delatorre *et al.*, (2006) através de eletroforese em presença de Dodecil sulfato de sódio e 2-mercaptoetanol, a lectina apresenta-se na forma de um tetrâmero composto de uma subunidade intacta  $\alpha$  (30900 Da) e de dois fragmentos  $\beta$  e  $\gamma$  (15.800 e 11.700 Da, respectivamente) num peso estimado em 25.5 KDa.



**Figura 1. Sementes de *Dioclea rostrata*.**

## 2- Resposta Inflamatória

A palavra inflamação deriva do latim “flanma” e seu emprego como termo médico decorre da associação entre uma fogueira e as características (quentura, vermelhidão e ardência) de certas lesões. A história conta que as quatro manifestações clínicas da inflamação (rubor, dor, calor e tumor) foram descobertas por Cornelius Celsus no início da era cristã e o grego Virchow adicionou o quinto sinal: a perda da função. Segundo Vilcek (2004) a inflamação é um conjunto de alterações (nos vasos sanguíneos, nos tecidos e nos fluidos internos) provocadas por lesões, infecções, substâncias nocivas ou distúrbios orgânicos e está estreitamente interligada ao processo de reparação.

Como demonstrado na Figura 2, a resposta inflamatória desencadeada pela imunidade inata é dividida em eventos vasculares e celulares, os quais são direcionados e amplificados por substâncias multifuncionais, dentre estas citam-se: citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, mediadores lipídicos e seus derivados, que promovem o recrutamento e a ativação de células como, por exemplo, polimorfonucleares, mononucleares, células epiteliais, endoteliais, fibroblastos, dentre outros (PELAIA *et al.*, 2003).

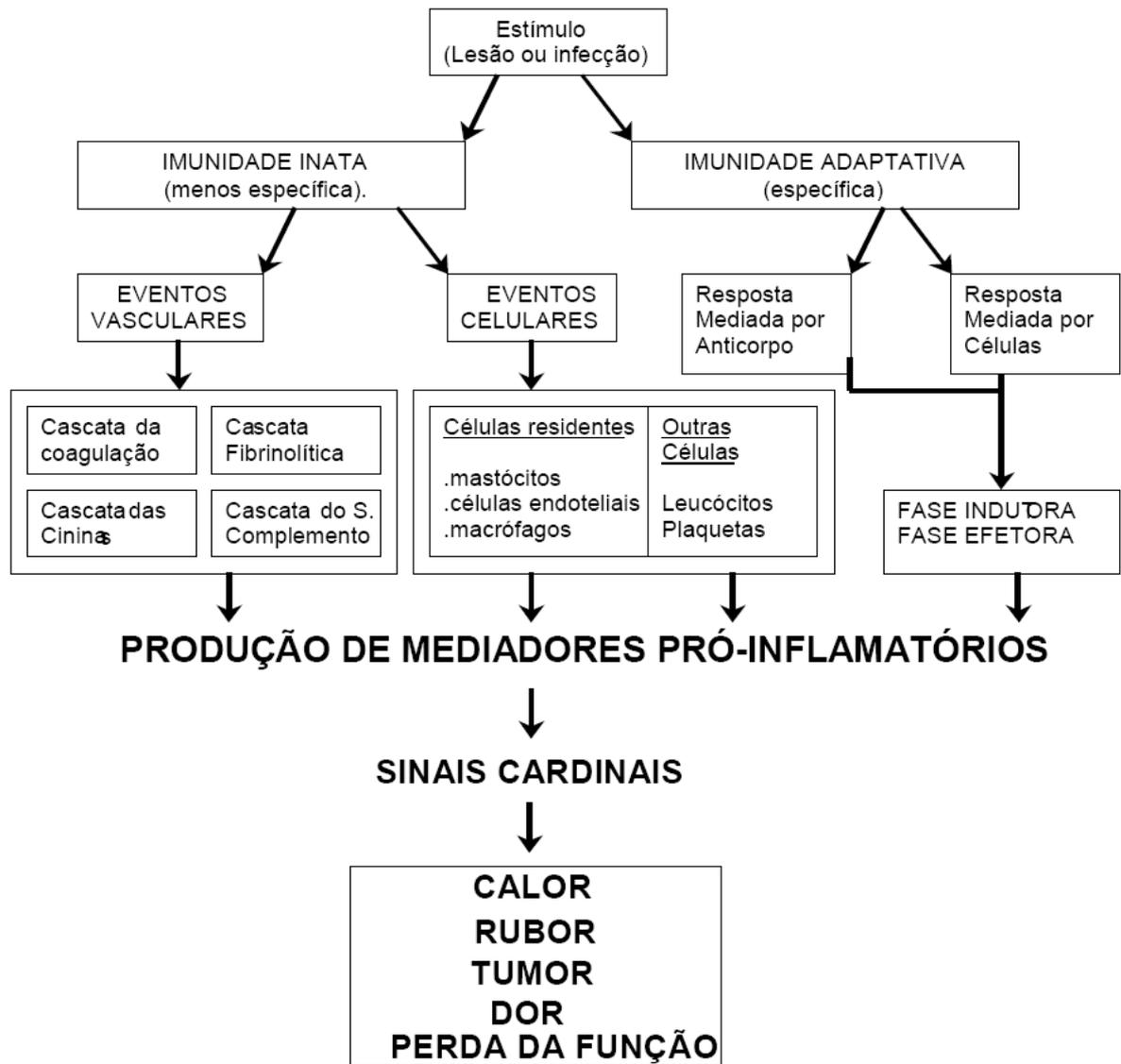


Figura 2. Diagrama da resposta inflamatória. Adaptada de BOXER, *et al.*; 2001.

Microscopicamente a inflamação envolve uma série de eventos complexos nos quais a mudança vascular é a que se inicia rapidamente e desenvolve-se durante as primeiras horas. Estas mudanças são reguladas por fatores que controlam a exsudação de líquidos, as quais ocorrem principalmente nas vênulas pós-capilares. Esta fase ocorre em associação entre neutrófilos e o endotélio das vênulas, a qual contribui para uma fase mais prolongada de aumento da permeabilidade vascular. O exsudato fluido é absorvido para dentro dos linfáticos, aonde deslocam-se para as glândulas linfáticas ou tecido linfático onde uma reação imune é então iniciada (CIRINO *et al.*; 2003).

O processo inflamatório é bastante variado e extremamente complexo, caracterizando-se por um aumento local do fluxo sanguíneo, exsudação de proteínas plasmáticas, migração e ativação de leucócitos, acompanhado por efeitos gerais (CONTRAN *et al.*, 1999). Em resposta a um processo inflamatório local, desencadeado por agente patogênico ou substância estranha, leucócitos são recrutados para o sítio inflamatório. Neste processo, a mobilização adequada e em tempo hábil dos leucócitos da microcirculação para o foco inflamatório é um evento essencial para a proteção do hospedeiro contra as infecções (MILLER *et al.*, 1992; BACON *et al.*, 1998).

O contexto do processo inflamatório ocorre em dois estágios. O primeiro que é desencadeado logo após a infecção (infecção aguda), caracterizada por infiltrado exclusivamente neutrofílico; e outro que depende ou não da resolução da fase aguda (inflamação crônica), apresenta duração prolongada com destruição tecidual e tentativa de reparo do tecido, caracterizando-se pela presença de macrófagos e linfócitos, além de angiogênese e proliferação do tecido conjuntivo (SEDGWICK & WILLOUGHBY, 1985).

Na maioria dos processos inflamatórios, os neutrófilos são os primeiros leucócitos a serem recrutados para o local de injúria tecidual. Estes permanecem de 12 a 24 horas no sítio inflamatório, ocorrendo posteriormente, um processo de morte celular programada (apoptose), e em seguida a fagocitose destas células por macrófagos. Eosinófilos, macrófagos e linfócitos aparecem progressivamente a partir da 6<sup>a</sup> hora, permanecendo no sítio inflamatório por cerca de uma semana, porém, se o agente agressor não for removido, ocorre a perpetuação e cronificação do processo. (COLLETI *et al.*, 1995; KASAMA *et al.*, 2005)

Uma vez presente no sítio inflamatório, os neutrófilos são capazes de fagocitar, destruir e degradar os microrganismos, sendo a destruição destes realizada por mecanismos dependentes de oxigênio, nitrogênio e enzimas proteolíticas. Os neutrófilos possuem um sistema enzimático oxidativo, acoplado a membrana plasmática, conhecido como nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase (NADPH), o qual é responsável pelo aumento do metabolismo oxidativo, também conhecido como explosão respiratória. Neste sistema, ocorre uma transferência de elétrons do NADPH intracelular para o oxigênio, reduzindo-o a anion superóxido ( $O_2^-$ ), o qual pode ser rapidamente convertido a peróxido de hidrogênio e este a radicais hidroxilas, denominados genericamente de intermediários reativos do oxigênio. Em geral, as quantidades de peróxido de hidrogênio formado, descrito no processo acima, não são capazes de induzir uma destruição eficaz dos microrganismos. No entanto, os grânulos azurófilos (lisossomos verdadeiros ou grânulos primários) dos neutrófilos contêm a enzima mieloperoxidase (MPO), que na presença de íons  $Cl^-$ , converte o peróxido de hidrogênio em hipoclorito, sendo este importante para a destruição do agente injuriante (Apud GRESPAN 2006).

Os capilares sanguíneos são revestidos por células endoteliais que apresentam junções intercelulares e possivelmente também pelo aumento no transporte vesicular através de endotélio, facilitando a entrada do anticorpo, complemento e outras moléculas de outros sistemas enzimáticos do plasma (sistema de coagulação, sistema fibronolítico e sistema das cininas) no local da inflamação. Este aumento do líquido no local da inflamação leva a um aumento da drenagem linfática, que pode ser benéfico por permitir que o agente agressor seja retirado e levado até os linfonodos onde entra em contato com as células do sistema imune adaptativo. A causa de tais modificações é a ação local dos chamados mediadores químicos da reação inflamatória aguda, também denominada primeira fase da inflamação (BROWN *et al.*; 1997).

No decorrer do processo de reparação, os tecidos lesionados pela inflamação são preenchidos por células da mesma origem daquelas lesadas, ou pela proliferação de tecido conjuntivo (i.e.; tecido cicatricial). Ou ainda por uma combinação destes fenômenos. Caso o processo inflamatório se prolongue, esse

poderá tornar-se prejudicial ao hospedeiro, e a sua expressão clínica dependerá da resposta inflamatória (BRODIE *et al.*; 1991; JUNQUEIRA *et al.*; 1987).

Os eventos vasculares consistem em dilatação inicial das pequenas arteríolas, resultando em um aumento do fluxo sanguíneo, seguida de redução e, posterior estase do sangue com aumento de permeabilidade das vênulas pós-capilares, com exsudação de líquido. Esses eventos são desencadeados por diversos mediadores químicos (histamina, bradicinina, serotonina), formados em decorrência da interação do microorganismo no tecido afetado (MOTA *et al.*; 2006).

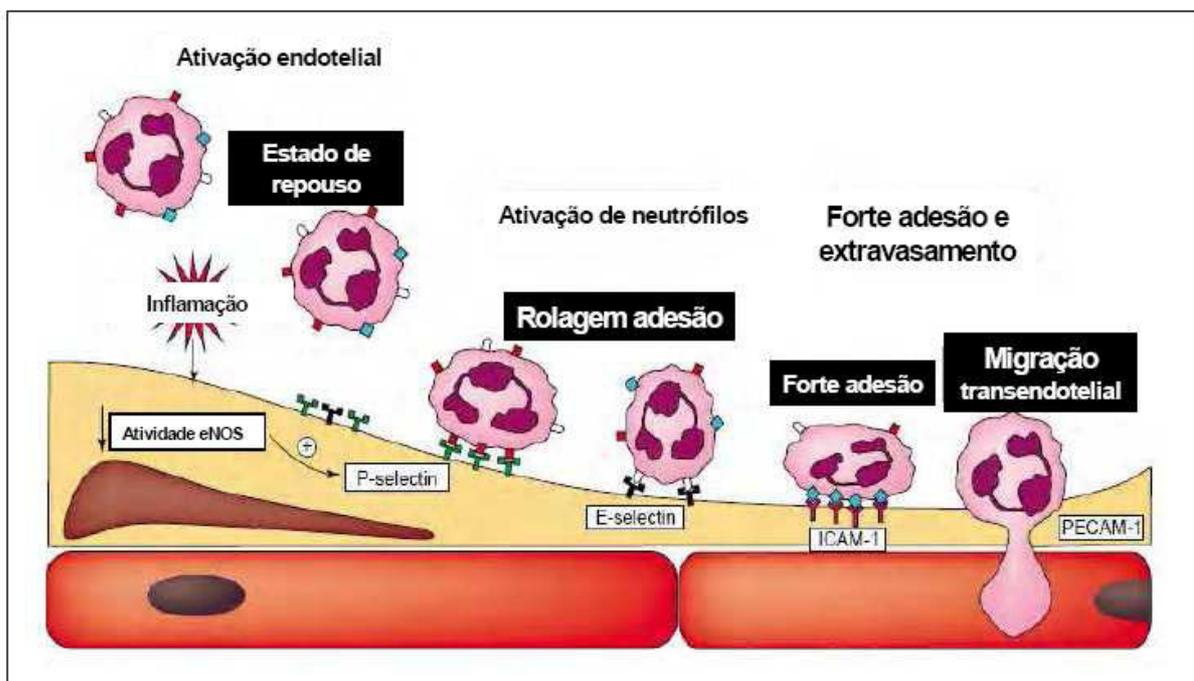
## **2.1. Migração de Leucócitos**

O sistema imune funciona como um sistema vigilante contra a invasão de patógenos, toxinas, lesões ou danos ambientais que perturbam a homeostase do organismo, procurando realizar a destruição rápida e eficiente dos mesmos. As células do sistema imune são os leucócitos, células derivadas da medula óssea que incluem células mielóides (neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), monócitos eosinófilos e basófilos) e linfócitos (células T, células B e células natural Killer (NK)) (BROWN *et al.*; 1997).

Para realizar a função de defesa, as células do sistema imune devem migrar através dos tecidos. As células T, por exemplo, que circulam continuamente através dos tecidos, sangue e linfa à procura de antígenos invasores, atravessam repetidamente barreiras e ao menos brevemente, entram em contato com a matriz extracelular (ECM). Da mesma forma, os macrófagos normalmente migram através dos tecidos removendo células apoptóticas ou necróticas e proteínas desnaturadas. Todas as células do sistema imune podem migrar rapidamente junto a algum sítio inflamatório ou infeccioso. Então, uma das características principais do sistema imune é a migração de células, um processo que exige eventos de adesão transitórios, reguláveis e reversíveis. (SHERWOOD *et al.*, 2004)

A seqüência de eventos que resulta na passagem dos leucócitos do vaso para os tecidos, chamado extravasamento, inclui três passos, (1) no vaso: marginação, rolagem e adesão; (2) transmigração através do endotélio (diapedese); (3) migração nos tecidos em direção a estímulos quimiotáticos. A marginação é causada por mudanças nas condições hemodinâmicas da circulação sanguínea e os

leucócitos assumem uma posição periférica ao longo da superfície endotelial. Em seguida, os leucócitos aderem firmemente (adesão). Depois, os leucócitos inserem pseudópodos entre as junções das células endoteliais assumindo uma posição entre estas células e a membrana basal. Eventualmente, os leucócitos atravessam a membrana e passam para o espaço extravascular (ROBINS *et al.*; 2004). Estes eventos são representados na figura 3.



**Figura 3. Interação entre leucócitos e a célula endotelial durante alteração vascular.** Adaptado por KAKKAR, 2004.

A adesão e transmigração de leucócitos são determinadas pela ligação entre as moléculas de adesão dos leucócitos e a superfície endotelial. Mediadores químicos-quimiotáticos e certas citocinas afetam este processo modulando a expressão superficial destas moléculas de aderência. Os receptores de aderência envolvidos pertencem a quatro famílias moleculares: selectinas, imunoglobulinas, integrinas e glicoproteínas semelhantes á mucina. As selectinas compreendem a E-selectina que é confinada ao endotélio; a P-selectina presente no endotélio e nas plaquetas; e L-selectina presentes em muitos tipos de leucócitos (KAKKAR, 2004).

## **2.2. Células envolvidas na inflamação**

### **2.2.1. Neutrófilos**

São os primeiros a chegar às áreas de inflamação, tendo uma grande capacidade de fagocitose. Estão envolvidos na defesa contra bactérias e fungos. Os neutrófilos possuem receptores na sua superfície como os receptores de proteínas do complemento, receptores do fragmento Fc das imunoglobulinas e moléculas de adesão. São células que não possuem a capacidade de divisão, com uma meia vida de sete dias e que dispõe de substâncias importantes para a eliminação de agentes agressores (ABBAS *et al.*, 2005).

Os neutrófilos possuem em seu interior três tipos de grânulos: os grânulos azurófilos que contém proteases e enzimas hidrolíticas, defensinas, mieloperoxidase, entre outros. Os grânulos específicos o qual contém entre outros elementos, apolactoferrina, colagenase e enzimas, que ativam a função quinto fator do sistema complemento. Finalmente, os grânulos que contém gelatinase e exibem receptor CD11/18 na membrana, são essenciais para a adesividade da célula. O citoesqueleto do neutrófilo é um complexo sistema de microfilamentos e microtúbulos que proporcionam a célula, uma grande habilidade na locomoção além de um movimento ordenado (BOXER *et al.*, 2001). Durante o metabolismo oxidativo, que é produzido por neutrófilos ativados, a mieloperoxidase, situada nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, promove a geração de ácido hipocloroso (HOCl) que está implicado na fagocitose (agente bactericida e citotóxica) (MUTZE *et al.*, 2003).

### **2.2.2. Macrófagos**

Macrófagos pertencem ao sistema fagocítico, que é um sistema composto por células com características morfológicas, imunológicas e funcionais semelhantes, estas células do sistema mononuclear incluem pró-monócitos e seus precursores na medula óssea, monócitos na circulação e macrófagos teciduais; são os principais responsáveis por desencadear o processo inflamatório, no momento da lesão uma vez que estas células ativadas liberam um fator quimiotático para neutrófilos na presença de antígenos como o LPS (RIBEIRO *et al.*, 1990).

Os macrófagos também secretam uma variedade de substâncias biologicamente ativas que participam da reação inflamatória e imune. Entre os produtos liberados destacam-se os metabólicos do ácido araquidônico, citocinas como Fator de necrose tumoral, interleucinas 1, 6, 10, fatores medulares, tais como o fator estimulador de colônias de granulócitos/monócitos, fatores regulatórios da inflamação, como glicocorticóides, componentes do sistema complemento entre outros (NATHAN *et al.*, 1997).

### **2.2.3. Mastócitos**

Mastócitos são derivados de células hematopoiéticas pluripotentes da medula óssea e apresentam diferenças morfofisiológicas de acordo com o tecido onde são encontradas; são capazes de secretar e produzir mediadores que podem modificar eventos celulares e vasculares. Entretanto, essas células possuem características histológicas semelhantes aos basófilos no sangue, apesar de possuírem certa similaridade são de linhagens diferentes (WELLE, 1997). Segundo Robins *et al.*, (2004) a membrana dos mastócitos possui receptores para uma classe especial de anticorpos, a imunoglobulina E (IgE), bem como para os terceiros e quinto fatores do sistema do complemento. A célula pode ser ativada para secretar mediadores através desses receptores, bem como por lesão física direta.

A principal função dos mastócitos é armazenar potentes mediadores químicos da inflamação, como a histamina, heparina, fator quimiotático dos eosinófilos (ECF), serotonina e fatores quimiotáticos dos neutrófilos. Esta célula não tem significado no sangue, sendo uma célula própria do tecido conjuntivo. É a principal célula responsável pelo famoso choque anafilático (ABBAS, 2005) Quando ativados, os mastócitos aumentam em número, tamanho e granulosidade.

### **2.3. Mediadores envolvidos no processo inflamatório**

A histamina e a serotonina estão envolvidas na vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular no local da inflamação. A liberação de histamina pelos mástocitos e basófilos é desencadeada por injúria tecidual, complexo antígeno-anticorpo e pelo sistema do complemento (YOKOYAMA, 1989). Segundo Yokoyama estes autores, o sistema de cininas tem como função a ativação das plaquetas e produção de bradicinina e caliceína. A bradicinina um potente agente vasoativo, produz vasodilatação, induzindo a liberação de fatores de relaxamento vascular derivados do endotélio (EDRFs), contração da musculatura lisa e produção de dor. A caliceína um agente quimiotático para neutrófilos. O sistema do complemento participa da resposta imune adaptativa, porém pode ser ativado por uma via alternativa a partir de endotoxinas, lipossacarídeos de parede bacteriana e por outros sistemas de enzimas plasmáticas. Tem função de opsonização de microorganismos, promove a degranulação de mastócitos e age como fator quimiotático de fagócitos.

A partir dos anos 90 foi sugerida a participação do óxido nítrico (NO) sendo um dos EDRFs liberados pelas células endoteliais. Demonstrou-se sua atuação na regulação do fluxo sanguíneo e aumento da permeabilidade vascular (KUBES *et al.*, 1995)

#### **2.3.1. Óxido Nítrico**

O NO é uma substância altamente reativa utilizada por neutrófilos para exercer sua função microbicida e é sintetizado a partir da combinação da L-arginina e do oxigênio molecular, tendo como principais cofatores o NADPH. Neutrófilos ativados expressam a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), que leva a produção de NO. Uma vez formado, o NO pode interagir com espécies reativas de oxigênio, levando a formação de múltiplos metabólitos antimicrobianos como peroxinitrito, S-nitrosotiois e o dióxido de nitrogênio (MULLIGAN *et al.*, 1993).

No sistema imune e na inflamação, o NO endógeno parece exercer efeitos pró e anti-inflamatórios. Os efeitos pró-inflamatórios do NO não são evidentes sob condições fisiológicas agudas, podendo, nestes casos, mediar funções anti-

inflamatórias, como a inibição de adesão de neutrófilos, atividade da cicloxigenase, formação de citocinas e reabsorção óssea (SCHMIDT & WALTER, 1994).

Os efeitos da produção de NO variam de acordo com o tipo de célula promotora, com a NOS envolvida e a quantidade de NO liberada, no local da inflamação. Pequenas quantidades de NO protegem os tecidos por inibição da proliferação de linfócitos T, limitando a adesão e a migração neutrofílica, mantendo a perfusão tecidual, através da vasodilatação e dos tecidos anti-plaquetários (KOSHLAND, 1992). Esses efeitos benéficos ocorrem, principalmente, quando o NO é produzido pela NOS constitutiva. Por outro lado, quando o NO é produzida em grandes quantidades há uma marcante citotoxicidade por inibição da respiração mitocôndrial, induzindo alterações no DNA.

O NO produzido por macrófagos e células polimorfonucleares, contendo radicais livres, contribui para a gênese de compostos citotóxicos como o peróxido nítrico (KOLB *et al.*, 1998). O NO é um mediador que possui papéis importantes na inflamação, entre os quais estão a redução da agregação plaquetária, vasodilatação e citotoxicidade para determinados micróbios e células tumorais (MONCADA *et al.*, 1994).

Durante a resposta imune mediada por células, a maioria das células adquire a capacidade de expressar a forma de NO induzida; a ação do NO depende da célula T reconhecer um antígeno específico, embora sua ação na resposta imune mediada por células não seja específica (SCHMIDT & WALTER, 1994). A expressão dos antígenos por macrófagos torna-se crucial para que haja a interação com linfócitos T e conseqüente secreção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ), um importante co-indutor da síntese de NO (THOMPSON *et al.*, 1998). Ficou evidenciado, por CUNHA e seus colaboradores (1993), que a fagocitose por si só não induz a síntese de NO; a fagocitose de partículas inertes por macrófagos peritoniais, em cultura, ou por macrófagos murinos, estimulados por interfon-gama (IFN- $\gamma$ ), não são estímulos suficientes para a indução expressiva de iNOS. No entanto, a fagocitose de agentes biológicos, nas mesmas condições, induz altos níveis de NO, sugerindo que a produção seja dependente de estímulo imunológico e que faça parte dos mecanismos de defesa do organismo.

IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e MIF (fator inibidor de macrófagos), após interagirem com seus receptores nos macrófagos, desencadeiam sinais intracelulares que culminam com a

ativação da NO. Por outro lado, citocinas como a IL-4, IL-10 quando ocupam seus receptores, desencadeiam sinais intracelulares que resultam na inibição da síntese de NO (CUNHA, *et al.*, 1993).

### **2.3.2. Citocinas**

As citocinas são em geral proteínas formadas por cadeias de aminoácidos e açúcares, com tamanhos diversos e atuam como mensageiros químicos entre a célula e o sistema imunológico, hematopoético e neuroendócrino; em condições normais são detectadas em quantidades muito pequenas no sangue e nos fluidos biológicos, mas durante inflamações podem atingir níveis milhares de vezes maiores, que persistem por meses na circulação (JANEWAY, 2006).

Desde as primeiras citocinas descobertas, um número considerável de suas funções foram descritas. Hoje em dia, é bem aceito que citocinas constituem uma ligação estreita entre danos celulares, reconhecimento imunológico e os sinais locais ou sistêmicos de inflamação. Em geral, elas são liberadas dentro uma sucessão controlada responsáveis pela produção dos mediadores finais envolvidos na indução de sinais inflamatórios (VERRI *et al.*, 2006)

As citocinas atuam através de mecanismos autócrinos e parácrinos, na célula-alvo, ligam-se a receptores específicos e de alta afinidade, ativando-os; na maioria dos casos, são supra-regulados na célula quando são estimulados. A maioria das citocinas exerce ação em receptores ligados à quinase, que regulam cascatas de fosforilação afetando assim sua expressão gênica (PHILP *et al.*, 2004).

Segundo Robins *et al.*, (2004), além de ações diretas sobre as células, algumas citocinas induzem a formação de outras citocinas (formando uma cascata de amplificação), enquanto algumas induzem a expressão dos receptores de outras citocinas e também podendo apresentar interações sinérgicas ou antagônicas com outras citocinas. A IL-6 por exemplo, é uma citocina multifatorial secretada por todas as células quando lesadas ou ativadas por IL-1 e/ou TNF- $\alpha$ . De outro modo, citocinas como a IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 e IFN-  $\alpha$  são eficientes em inibir *in vitro* a síntese de IL-1 e TNF- $\alpha$ . As citocinas incluem peptídeos tanto pró-inflamatórios quanto antiinflamatórios.

As citocinas pró-inflamatórias participam em reações inflamatórias agudas e crônicas, bem como nos processos de reparo. O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória que apresenta papel chave em diversos processos, como a inflamação, imuno-modulação, crescimento, angiogênese e citotoxicidade. Está bem descrito na literatura, a participação do TNF- $\alpha$  no recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório (CANETTI *et al.*, 2003). Embora, o TNF- $\alpha$  não seja considerado um fator quimiotático clássico, uma vez que não induz migração de neutrófilos *in vitro*, este promove a síntese e liberação de fatores quimiotáticos, como as quimiocinas (ROBINS *et al.*, 2004)

Entre os muitos efeitos fisiopatológicos do TNF- $\alpha$  estão o choque, a citotoxicidade e a caquexia, os quais ocorrem a partir de sua ligação a dois tipos distintos de receptores presentes nos neutrófilos e nas células endoteliais (WAGNER, 2000). Quanto aos efeitos parácrinos ou tecido-específicos do TNF- $\alpha$ , os mais estudados são aqueles relacionados à sua participação na mediação de vários eventos que ocorrem nos processos inflamatório agudo e crônico. Dentre estes, destacam-se a ativação de neutrófilos, com conseqüente degranulação, produção de intermediários reativos de oxigênio, aumento da citotoxicidade para certos patógenos e o aumento de atividade fagocítica, quimiotaxia de neutrófilos e de monócitos; aumento da adesão ao endotélio (VERRI *et al.*, 2006).

Os neutrófilos podem responder ao TNF- $\alpha$  pela ativação e expressão de integrinas, produção do fator de agregação de plaquetas (PAF) e outros mediadores granulocíticos. Da mesma forma as células endoteliais mobilizam selectinas, regulam positivamente as moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) e ativam vias pró-coagulantes em resposta a exposição ao TNF- $\alpha$ . Durante a inflamação os polimorfonucleares liberam, a partir de suas membranas, um receptor solúvel para TNF- $\alpha$  que, uma vez ligado, pode efetivamente inativar o TNF- $\alpha$  circulante (WAGNER *et al.*, 2000).

O TNF- $\alpha$  estimula células endoteliais e macrófagos a secretar quimiocinas que acentuam a afinidade das integrinas leucocitárias por seus ligantes e induzem a quimiotaxia de leucócitos e recrutamento. Ele também atua nos fagócitos mononucleares para estimular a secreção de IL-1, esse é um exemplo de uma

cascata de citocinas que possuem atividades biológicas semelhantes ou complementares (ABBAS, 2005)

A interleucina IL-1, conhecida sob várias denominações em mais de quarenta anos, é um importante mediador da inflamação e da febre. Suas fontes celulares e efeitos fisiológicos são semelhantes ao do TNF- $\alpha$  e ambas são, frequentemente, encontradas juntas por que a via de sinalização da IL-1 compartilha intermediários bioquímicos com a via do TNF (ABBAS, 2005). Como o TNF- $\alpha$ , a IL-1 induz a expressão de selectina e ICAM-1 nas células endoteliais e promovem a ativação de integrinas nas células polimorfonucleares (WAGNER, 2000).

A produção de IL-1 por fagócitos mononucleares pode ser induzida por produtos bacterianos, tais como lipossacarídeos, e até mesmo por outras citocinas, tais como o TNF, a IL-1 é produzida por muitos tipos celulares que não os macrófagos, tais como neutrófilos, células epiteliais e células endoteliais. Quando secretadas em baixas concentrações, a IL-1 atua como um mediador da inflamação local; quando secretadas em maiores quantidades, ela entra na corrente sanguínea e exerce efeitos endócrinos (ABBAS, 2005). A IL-1 não induz a morte apoptótica das células, e mesmo em altas concentrações sistêmicas, por si só ela não causa as alterações fisiopatológicas do choque séptico (VERRI *et al.*, 2006).

Existem, entretanto, citocinas com ações inibitórias sobre a produção de outras citocinas. Um exemplo é a ação inibitória da IL-4 sobre a IL-6 na produção de TNF ou IL-1 por monócitos. A IL-10 é outro peptídeo cujas funções biológicas principais parecem ser a inibição de citocinas liberadas por linfócitos Th1 ou por monócitos e macrófagos. Muitas das ações antiinflamatórias ou imunossupressoras de TGF- $\beta$  também parece resultar de sua habilidade de suprimir a produção de citocinas em células T e em fagócitos mononucleares (VILCEK, 2004).

Assim, as citocinas pró-inflamatórias podem ser responsáveis por muitos sintomas relacionados a processos inflamatórios via suas ações locais e sistêmicas ou ainda, induzindo a produção de outros mediadores e iniciando uma cascata de efeito diversos (KASAMA *et al.*; 2005).

### 2.3.3. Quimiocinas

Quimiocinas são citocinas de baixo peso molecular (8-14 KDa) que desempenham importante papel em processos fisiológicos e nas reações imunes e inflamatórias (PROUDFOOT *et al.*; 2003). Elas recrutam seletivamente populações de células inflamatórias distintas para sítios de inflamação de acordo com a expressão diferencial de seus receptores nestas populações. A classificação dos diferentes grupos de quimiocinas é baseada na existência de um ou mais resíduos de cisteína e na ausência ou existência de um ou mais aminoácidos entre dois resíduos conservados de cisteína na porção amino-terminal da molécula. Atualmente elas se encontram divididas em quatro grupos: CXC ou a quimiocinas, CC ou b quimiocinas, C ou g quimiocinas e CX3C ou d quimiocinas. As a quimiocinas são subdivididas em dois grupos, de acordo com a presença da seqüência conservada de aminoácidos ELR (ácido glutâmico - leucina - arginina) precedendo a seqüência CXC. As quimiocinas ELR+ atraem basicamente neutrófilos, enquanto que aquelas que não contêm esta seqüência atraem linfócitos T e B. As CC quimiocinas exercem ação em vários tipos de leucócitos, incluindo monócitos, basófilos, eosinófilos, linfócitos T, células dendríticas e células NK, mas geralmente não recrutam neutrófilos (MANTOVANI, 1999 & PROUDFOOT *et al.*; 2003).

As quimiocinas envolvidas em reações inflamatórias são produzidas por leucócitos em resposta a estímulos externos, e regulam o tráfego celular através dos tecidos sendo produzidas constitutivamente por várias células neste tecido. Estas moléculas quimioatraentes são secretadas nos sítios de infecção e inflamação por células que compõem o parênquima, leucócitos recrutados e células endoteliais ativadas por citocinas; elas são localmente retidas por componentes da matriz extracelular e proteoglicanos de superfície celular que resulta em aumento de sua meia vida e sua capacidade de induzir estímulo inflamatório. Os leucócitos rolam sobre o endotélio num processo mediado por selectinas e interagem com as quimiocinas retidas nos proteoglicanos da superfície das células endoteliais. Tal interação promove a ativação das integrinas que mediarão a adesão estável e transmigração para o tecido (MANTOVANI, 1999).

Receptores de quimiocinas são estruturas protéicas, que apresentam sete domínios trans-membranares, com a região amino-terminal voltada para a região extracelular e a carboxi-terminal para o meio intracelular. Os receptores de quimiocina exibem ou não sobreposição em relação aos seus ligantes, contudo a afinidade por cada um deles é variável. E a expressão deles pode variar entre as diferentes subpopulações de células T ou estado de ativação das mesmas (PROUDFOOT *et al.*; 2003).

Modelos de inflamação de diferentes etiologias têm contribuído para elucidação do papel fisiológico das quimiocinas. Em lesão hepática associada à doença enxerto versus hospedeiro (GVH), foi observado o predomínio de células T CD8+ expressando o receptor de quimiocina CCR5 no fígado, assim como a expressão do seu ligante CCL3/MIP-1a pelas células endoteliais, células epiteliais do ducto biliar intralobular e células inflamatórias, como linfócitos e macrófagos. A administração de anticorpos neutralizantes, anti-CCL3/MIP-1a ou anti-CCR5, reduziu dramaticamente a entrada de células CD8+CCR5+ e, conseqüentemente, o dano hepático (MURAI *et al.*, 1999). A interleucina 8 (IL-8) é uma importante quimiocina ativadora de neutrófilos, sendo produzida por um grande número de células, entre elas: macrófagos, neutrófilos, células endoteliais e fibroblastos, a IL-8 pode ter diferentes designações isto depende do tipo de espécie envolvida, por exemplo, em humanos temos IL-8, em camundongos MIP e em ratos kc (VERRI *et al.*, 2006).

Os vários mediadores inflamatórios normalmente atuam restringindo as conseqüências e a extensão do dano tecidual, induzindo somente os sinais locais. Entretanto, dependendo da persistência e/ou intensidade da lesão, alguns mediadores podem difundir-se e mediar sinais e sintomas sistêmicos como febre, aumento da produção de proteínas de fase aguda, leucocitose, ativação do sistema complemento, aumento da produção de glicocorticóides, alterações metabólicas e das concentrações plasmáticas de metais como ferro, cobre e zinco. (SHERWOOD *et al.*; 2004)

### 3. Justificativas e Objetivos

Nos últimos anos tem se observado um crescente interesse não somente da indústria farmacêutica, mas também dos órgãos governamentais, no que diz respeito ao estudo de moléculas normalmente presentes na natureza. Esta linha de raciocínio tem sido seguida considerando que, o reino vegetal é extremamente vasto, principalmente no nosso país que é privilegiado por uma riqueza de biodiversidade. A utilização de produtos naturais quer seja na elaboração de drogas ou insumos biotecnológicos, surge como uma vertente para o desenvolvimento e crescimento de muitas áreas importantes relacionadas ao bem estar da população.

O estudo dos mecanismos e dos mediadores envolvidos no processo inflamatório, vem sendo alvo de inúmeras pesquisas ao longo dos últimos quarenta anos. Inúmeros trabalhos têm sido realizados com objetivos que variam desde a elucidação do mecanismo das respostas imunológicas desencadeadas por diversas doenças inflamatórias, bem como a descoberta de ferramentas farmacológicas para a resolução destas patologias

Estudos que investigam possíveis atividade biológicas para as lectinas ocorrem concomitantemente com estudos direcionados a caracterização estrutural destas moléculas.

Desta forma, este estudo foi delineado com o objetivo geral de avaliar a atividade da lectina de sementes de *Dioclea rostrata* sobre os aspectos celulares e vasculares da inflamação em modelos experimentais. Para tanto, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- Investigar o possível efeito da lectina em induzir resposta inflamatória, quando administrada localmente. Para tanto, foram usados os modelos de peritonite e edema de pata em ratos.
- Investigar o envolvimento do domínio lectínico na atividade pró-inflamatória da lectina, através da associação desta com seu açúcar específico ( $\alpha$ -metil-D-manosídeo)
- Avaliar a importância da estrutura tridimensional da lectina na efetuação da resposta inflamatória

- Investigar possíveis mediadores envolvidos na resposta inflamatória induzida pela lectina. Para tanto, foram utilizados diferentes bloqueadores farmacológicos dos principais mediadores da inflamação.
- Investigar a participação de células residentes na resposta inflamatória induzida pela lectina. Esta abordagem foi realizada modificando-se a população de células residentes (macrófagos e mastócitos) da cavidade peritoneal dos animais.
- Evidenciar a importância do macrófago na atividade pró-inflamatória da lectina, utilizando o modelo de bolsa de ar subcutânea “Air Pouch”.
- Verificar a liberação de substâncias quimiotáticas por cultura de macrófagos estimulados pela lectina, bem como a caracterização destas substâncias.
- Caracterizar a resposta edematogênica induzida pela lectina através da determinação da expressão da mieloperoxidase.
- Em extensão ao estudo do mecanismo de ação da migração de neutrófilos induzida pela lectina de *D. rostrata*, objetivamos também, investigar sua interação direta com os neutrófilos. Para tanto, utilizamos o modelo de quimiotaxia *in vitro*.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) fêmeas com peso entre 150 e 220g, procedentes do Biotério Central do Campus do Pici da Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (UFC). Estes animais receberam ração e água *ad libitum*, sob condições adequadas de luz e temperatura. Todos os protocolos experimentais foram executados em acordo com as normas estipuladas pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais da UFC.

### 4.2. Lectinas

A lectina de sementes de *Dioclea rostrata* foi isolada e purificada no Laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas (BioMoLab) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC), através de cromatografia de afinidade em Sefadex G-50 (CAVADA *et al* 1996) . A pureza de todas as preparações da lectina foi avaliada individualmente através de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS e betamercaptoetanol.

### 4.3. Drogas e Reagentes

- Ácido Sulfúrico (Sigma)
- Água destilada (AD);
- Albumina sérica bovina (Sigma)
- Álcool etílico 70%;
- Álcool iodado;
- Anticorpo biotinilado TNF- $\alpha$  (Dako)
- Anticorpo biotinilado de interleucina 1 (Dako)
- Anticorpo biotinilado de interleucina 10 (Dako)
- Avidina – horseradish peroxidase (Dako A/S, Denmark)

- Azul de Toluídina
- $\alpha$ -metil-D-manosídeo (Sigma)
- Celecoxibe (Merck)
- Cloreto de Sódio (NaCl, Merck)
- Composto 48/80 (Sigma)
- Corante de HEMA 3
- Dexametasona - Decadronal® (Prodome Química Farmacêutica)
- Dimetil sulfóxido - DMSO® (Sigma)
- Fosfato de Sódio (Merck)
- Formol (Merck);
- N-formil-metil-L- metionil-L- leucil-L-fenilalanina (fMLP) (Sigma)
- Gradiente de Ficoll Hypaque (Sigma)
- Gradiente de Percoll 65% (Sigma)
- Heparina 5.000 UI/mL (Roche)
- Indometacina (Prodome Química e Farmacêutica)
- Lectina de sementes de *Dioclea rostrata* dissolvida em solução salina 0,15 M
- Meclizina (Sigma)
- Metil-celulose 0,1% (Sigma)
- N-formil-metil-L-metionil-L-leucil-Lfenilalanina (fMLP) (Sigma)
- MK-886 (inibidor de lipoxigenase)-L-663, 536(3-[1-(4-clorobenzil)-3-t-butil-5isopropilindol-2,2-ácido dimetilpropanóico (Merck)
- Ortofenileno diamina (Sigma)
- Ovidina-horsedish peroxidase (Dako, Denmark)
- Proteína C ativada (Merck)
- Pentoxifilina (Merck)
- Peróxido de Hidrogênio (Sigma)

- Sefadex G-50 (Pharmacia)
- Soro de cabra (Peptotec)
- Soro de carneiro (Peptotec)
- Talidomida (CEME)
- Tioglicolato (Lab Difco Ltda)

A maioria das substâncias foi preparada em solução estéril de NaCl 0,15 M ou água bidestilada. A talidomida foi dissolvida em salina ácida pH 5.0, o PCA dissolvido em DMSO. Indometacina foi dissolvida em Tris. HCL pH 8.0, MK-886 em solução de metil-celulose (0,1% em água destilada) e tioglicolato, em água bidestilada, sendo aquecido para sua completa diluição.

#### **4.4. Aparelhos e Instrumentos Laboratoriais**

Os principais equipamentos utilizados nesse trabalho foram os seguintes:

- Agulhas 29G e 25 G;
- Agitador magnético Thermolyne, mod M37510/26
- Agitador para tubos de ensaio mod. TE089 (MARCON)
- Alicates para deslocamento cervical
- Balança para pesagem dos animais, mod. ID-1500 (FILIZOLA);
- Balança analítica, digital modelo 260 (MARTE);
- Banho -maria modelo 100 (FANEN);
- Base emborrachada para permanência do animal;
- Bastão de vidro;
- Beckers de 5, 10 e 50 mL;
- Câmaras de Boyden
- Câmaras de Neubauer (0,100/0,0025 mm<sup>2</sup>)
- Citocentrífuga, mod. 248 (FANEM)
- Estufa de CO<sub>2</sub>

- Filtro Millipore SW INEX-13 n.2
- Geladeira e freezer;
- Instrumental cirúrgico (pinças, bisturis, tesouras, etc.)
- Lâminas e lamínulas;
- Luvas descartáveis;
- Medidor de pH (pHmetro, MICRONAL)
- Membrana de policarbonato (5µm Milipore Corp., Bedford, MA)
- Microscópio óptico binocular;
- Microcâmara de 48 poços (NEUROPROBE Inc. CABIN JOHN, MD)
- Micrótomo modelo 820 SPENCER - American Optical Corporation;
- Micropipetas automáticas (GILSON)
- Placa de cultura de 48 poços
- Pletismômetro Hugo Basile (7140);
- Politron (Ultra-Max)
- Seringas de insulina 0,5 cc com agulha 29G ultrafina (13 x 3,3), de 1 e de 5 mL ( BENSON - DIKSON);
- Sistema AMICON Diaflo ultrafilters (AMICON Division, W.R. Grace & Co. Beverly, MA)
- Tubos plásticos de 15 mL (FALCON).

## 5. Modelos Experimentais

### 5.1. Avaliação da atividade pró-inflamatória da lectina de *Dioclea rostrata*

#### 5.1.1. Modelo de peritonite

Para avaliação da migração de neutrófilos induzida pela Dros, esta foi administrada intraperitonealmente (i.p.) nas doses de 125, 250, 500 e 1000 µg/cavidade em 1 mL de salina estéril, estas doses foram baseadas em estudos anteriores com lectinas vegetais. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical ao final da 4<sup>a</sup> hora após a injeção da lectina. Em seguida, as células presentes na cavidade peritoneal foram coletadas através da lavagem destas cavidades injetando-se 10 mL de salina contendo 5 UI/mL de heparina. Os abdomens dos animais foram levemente massageados, e através de uma incisão foram coletados cerca de 7 mL de fluido peritoneal, com pipeta de Pasteur de plástico. As contagens total de diferencial de leucócitos foram realizadas conforme metodologia descrita por Souza & Ferreira (1985). Neste procedimento, 20 µL do fluido coletado de cada animal foram diluídos em 380 µL do reagente de Turk e posteriormente usados para a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer. A contagem diferencial das células foi realizada através de esfregaços corados em lâminas. Para tanto, 50 µL do exsudato foram centrifugados em citocentrífuga a 400 x g, durante 10 min, após este processo os esfregaços foram corados pelo método de hematoxilina- eosina (corante HEMA 3). A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada usando-se microscopia óptica e expressa como a média ± E.P.M. do número de neutrófilos/µL do fluido peritoneal e comparados aos valores obtidos nos grupos controle do experimento, ou seja, animais que foram tratados apenas com salina estéril.

### **5.1.2. Curso Temporal da Migração de Leucócitos para cavidade peritoneal induzida pela lectina de *Dioclea rostrata*.**

Com o intuito de avaliar o curso temporal, bem como o perfil da migração leucocitária (neutrófilos e mononucleares) induzida pela lectina, esta foi administrada i.p. em 1 mL de salina estéril, na menor dose que apresentou efeito pró-inflamatório (500µg/cavidade). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical ao final de intervalos de tempo que variavam de zero a 96 horas, sendo a migração de leucócitos avaliada no fluído peritoneal, conforme descrito no item 5.1.1.

### **5.1.3. Investigação do envolvimento do domínio lectínico na atividade pró-inflamatória da lectina de *Dioclea rostrata*.**

Para investigarmos se o sítio de ligação a carboidrato da lectina está envolvido na sua habilidade em induzir migração de neutrófilos, este foi bloqueado através da incubação da lectina (37 °C/30 minutos) em solução 0,2 M com seu açúcar específico ( $\alpha$ -metil-D-manosídeo). A lectina (500 µg/cav.) foi administrada i.p. sozinha ou em solução com  $\alpha$ -metil-D-manosídeo. A avaliação da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi feita conforme descrito anteriormente no item 5.1.1.

### **5.1.4. Efeito da desnaturação térmica da lectina sobre a migração de neutrófilos induzida por lectina de *Dioclea rostrata*.**

Para demonstrarmos a importância da estrutura tridimensional da lectina na atividade pró-inflamatória realizamos a desnaturação da proteína. Para tanto a lectina, em solução foi submetida à fervura (100°C) durante 10 minutos. Em seguida a lectina foi testada no modelo de peritonite, seguindo a metodologia descrita no item 5.1.1. Os resultados obtidos foram comparados àqueles obtidos com a proteína não desnaturada.

### **5.1.5. Modulação farmacológica da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida pela lectina de *Dioclea rostrata*.**

Com o objetivo de se investigar possíveis mediadores envolvidos na migração de neutrófilos induzida pela lectina, esta foi administrada i.p. (500 µg/cav.) em diferentes grupos de animais pré-tratados com diferentes bloqueadores farmacológicos como a seguir: dexametasona (2 mg/Kg; s.c.); talidomida (200 mg/Kg; s.c.); pentoxifilina (100 mg/Kg;s.c.); celecoxibe (30 mg/Kg, s.c.), meclizina (40 mg/Kg; s.c.) e MK 886 (1 mg/Kg; v.o.) 1 hora antes da administração da lectina e com indometacina (10 mg/Kg; s.c) e PCA (10 mg/Kg; s.c.), 30 minutos antes da Dros.

A migração de neutrófilos foi avaliada 4 horas após a administração da lectina como descrito anteriormente no item 5.1.1.

## **5.2. Mudanças na população de células residentes da cavidade peritoneal**

Com o objetivo de investigar se a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos induzida pela lectina é um efeito dependente ou não de células residentes, e quais destas células poderiam estar envolvidas nesta resposta, foram realizados os seguintes experimentos:

### **5.2.1. Pré-tratamento com tioglicolato: incremento da população de macrófagos residentes na cavidade peritoneal**

Tioglicolato (Tg; 3% m/v; 10 mL) foi administrado i.p. e 4 dias após os macrófagos peritoneais foram coletados, contados e comparados com a contagem obtida em grupo de animais não tratados com Tg (controle), de acordo com a metodologia descrita por Ribeiro e colaboradores (1991).

Lectina (500 µg/cav.) e fMLP ( $10 \times 10^{-9}$  moles/cav.) foram administrados i.p. em animais tratados ou não com tioglicolato. Conforme descrito para o modelo de peritonite no item 5.1.1., a migração de neutrófilos foi avaliada 4 horas após a injeção dos estímulos, sendo os resultados comparados com os obtidos em animais que receberam somente salina estéril i.p..

### **5.2.2. Pré-tratamento com o composto 48/80: depleção de mastócitos peritoneais**

A depleção de mastócitos da cavidade peritoneal dos animais pelo composto 48/80, foi feita pelo método descrito anteriormente por Di Rosa e colaboradores (1971). Para tanto, os animais foram pré-tratados i.p., durante quatro dias consecutivos, duas vezes ao dia com o composto 48/80. As dosagens utilizadas foram: no primeiro dia 0,6 mg/Kg, no segundo dia 1,0 mg/Kg, no terceiro dia 1,2 mg/Kg e no quarto dia 2,4 mg/Kg. No quinto dia após o início do tratamento, a depleção dos mastócitos foi avaliada através da coleta do fluido peritoneal dos animais o qual foi diluído (1:5) em azul de toluidina e a contagem feita em câmara de Neubauer.

Os resultados foram comparados com aqueles obtidos no grupo de animais não tratados com o composto 48/80. A viabilidade celular foi avaliada, observando-se o número de mastócitos íntegros ou degranulados e também pela presença de células contaminantes.

Lectina na dose de (500 µg/cav) e fMLP ( $10 \times 10^{-9}$  moles/cav.) foram injetados i.p. em animais tratados ou não com composto 48/80. A migração de neutrófilos foi quantificada 4 horas após a injeção dos estímulos e os resultados comparados aos respectivos controles.

### **5.3. Bolsa de ar subcutânea (“Air pouch”)**

O “air pouch” foi produzido na pele do dorso dos animais de acordo com método descrito por Edwards *et al.*, 1981. Inicialmente, após depilação do dorso dos animais e assepsia com álcool iodado foram injetados subcutaneamente 20 mL de ar estéril. Três dias após, a cavidade formada foi mantida injetando-se 10 mL de ar. No sexto dia após a injeção inicial de ar os animais foram utilizados para os experimentos de migração.

A avaliação da migração de neutrófilos seguiu-se ao procedimento experimental descrito para o modelo de peritonite (item 5.1.1). A lectina (500µg) foi administrada em 1 mL de solução/bolsa. Os animais foram sacrificados seis horas após a injeção da lectina e a lavagem da cavidade artificial foi feita com 5 mL de salina heparinizada. A migração de neutrófilos para a bolsa de ar foi avaliada pelo

contagem total e diferencial dos leucócitos. O grupo controle do experimento era constituído por animais que receberam 1 mL de salina estéril.

#### **5.4. Cultura de células: Macrófagos peritoneais**

Macrófagos peritoneais foram obtidos de ratos normais que haviam sido tratados por via intraperitoneal com 10 mL de tioglicolato a 3% em água destilada, seguindo o método descrito por Cunha & Ferreira (1986). Após quatro dias, os animais foram sacrificados e o exsudato peritoneal foi coletado em condições estéreis, após ser injetado 10 mL de RPMI incompleto, pH 7,4 contendo heparina.

Em seguida, as células foram lavadas duas vezes em RPMI incompleto por centrifugação a 100 x g durante 5 minutos. O precipitado final foi ressuspensão em 1 mL de RPMI incompleto, sendo então diluído (1:20) em solução de Turk para contagem total das células em câmara de Neubauer. As células foram ressuspensas em RPMI incompleto, na concentração de  $2 \times 10^6$  células /mL e distribuídas em placas de cultura de 24 poços (1 mL/poço).

Para aderência dos macrófagos na placa esta foi incubada por 1 hora em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%. Após este período o sobrenadante foi descartado e as células aderidas foram lavadas 3 vezes com RPMI incompleto e incubadas por 12 horas em CO<sub>2</sub> a 5%. Para o período de incubação foi adicionado 1 mL de RPMI completo em cada poço. Ocorrendo a incubação, as células não aderidas foram removidas por três lavagens de RPMI incompleto.

#### 5.4.1. Dosagem de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-10

As concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-10 foram determinadas por “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA) no líquido peritoneal dos animais induzidos com Dros na dose de 500 $\mu$ g/cav..

O ensaio para determinação da concentração de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-10 foi realizado baseado em protocolo já descrito (TAKTAK *et al.*, 1991). Brevemente, placas de microtitulação (96 poços) foram recobertas com 50  $\mu$ L de tampão PBS contendo 2,0  $\mu$ g/mL do anticorpo monoclonal (mAb) anti-TNF- $\alpha$ , anti IL-1 e anti IL-10 (purificado do soro de carneiro; Peptotec). A placa foi incubada durante uma noite a 4°C. Após esse período, a placa foi lavada de 3 a 5 vezes com PBS contendo 0,1% Tween 20 (PBS-T; 200  $\mu$ L/poço), e em seguida foram incubadas com 50  $\mu$ L de solução de bloqueio (1% de albumina bovina) durante 2 h em temperatura ambiente. A placa foi lavada conforme descrito acima e, em seguida adicionou-se as amostras testes (triplicata), colhidas do fluido peritoneal que foram injetadas com o sobrenadante da cultura de macrófagos e concentrações decrescentes de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-10 (Peptotec) diluída em PBS-Tween (o primeiro ponto da curva-padrão de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-10 utilizado foi de 2000 e 10 pg/mL, respectivamente; diluído em PBS com 0,5% de BSA). A placa foi novamente coberta e mantida durante 12 horas a 4°C. No terceiro dia, a placa foi lavada por três vezes e adicionados os anticorpos biotinizados anti-TNF- $\alpha$ , anti-IL-1 e IL-10 (1:1000 em solução de lavagem contendo 1% de soro de cabra, Peptotec).

Após 1 h de incubação à temperatura ambiente, a placa foi lavada e em seguida adicionou-se 50  $\mu$ L de uma solução 1:5000 do conjugado avidina-horseradish peroxidase (DAKO A/S, Denmark) diluída em PBS-T. Após incubação por 30 minutos, a placa foi lavada e incubada com 50  $\mu$ L do substrato dihidrocloro de 1,2-fenilenodiamina (ortofenileno diamina, OPD, Sigma) diluído em tampão e adicionado com 0,4  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% por mL.

Após o desenvolvimento da cor, a reação foi interrompida pela adição de 75  $\mu$ L de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 1M. A medida da absorbância foi determinada a 490 nm. Os resultados foram expressos em pg/mL de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-10 com base na curva padrão obtida.

## **5.5. Modelo de edema de pata.**

Os volumes das patas direitas de cada animal foram medidos plestimograficamente antes da administração local da lectina, considerando-se este o tempo zero. Em seguida, a lectina foi injetada por via subcutânea intraplantar (125, 250, 500 e 1000 µg/pata) em 0,1 mL de salina estéril. Os volumes de líquido deslocados pelas patas foram medidos 30 minutos e 1, 2, 3, 4, 8, 24 e 48 horas após a administração da lectina. O edema foi calculado como a variação de volume, ou seja, a diferença entre o volume em um determinado tempo após o estímulo e o volume antes do estímulo (tempo 0). As áreas sob as curvas (ASC) foram calculadas usando método do trapézio segundo Landucci e seus colaboradores (1995).

Os resultados foram expressos como volume de edema (mL) e também unidades arbitrárias (ASC) sendo comparados aqueles obtidos nas patas dos animais que foram injetados com 0,1 mL de salina.

### **5.5.1. Atividade da Mieloperoxidase (MPO) nas patas dos animais**

A determinação da atividade da mieloperoxidase foi avaliada no edema de pata, induzido pela lectina (125 µg/pata) conforme item 5.6. A atividade da MPO foi determinada por um ensaio cinético-colorimétrico descrito por Souza *et al.*, 2001 com algumas alterações.

Após 4 horas da indução do edema amostras do tecido das patas dos animais foram coletadas, pesadas e trituradas em Politron Ultra-Max em solução (NaCl, NaPO<sub>4</sub>, NaEDTA), sob condições adequadas de refrigeração. A seguir, foram centrifugadas a 13.000 ×g durante 15 minutos a 4°C. O precipitado obtido foi ressuspenso na mesma solução tampão e novamente centrifugado. O novo precipitado obtido foi ressuspenso em uma segunda solução tampão (NaPO<sub>4</sub> e H-TBA), re-homogenizado, congelado e descongelado e centrifugado a 4°C, durante 15 minutos, com frequência de 10.000 a 20.000 rpm. O sobrenadante foi colhido e devidamente armazenado para posterior ensaio da mieloperoxidase, utilizando placa de 96 poços e leitura da densidade óptica a 450 nm espectrofotômetro.

A atividade de MPO foi comparada a uma curva padrão de neutrófilos de ratos processado da mesma maneira. Os resultados foram apresentados como a atividade de MPO (número de neutrófilos/mg de tecido).

### **5.6. Quimiotaxia de neutrófilos *in vitro***

A verificação da possível interação e estimulação direta da Dros com neutrófilos foi feita utilizando-se um modelo de quimiotaxia em câmara de Boyden. Para tanto, neutrófilos humanos viáveis (90-95% de pureza) foram obtidos em sangue venoso heparinizado colhido de indivíduos saudáveis. Os neutrófilos foram isolados por fracionamento em gradiente de Histopaque (Sigma) e em seguida foram suspensos em RPMI 1640 contendo 0,1% de albumina bovina sérica (BSA), de modo a se obter uma suspensão de  $10^6$  neutrófilos/mL. A migração foi avaliada em microcâmara de 48 poços (Neuroprobe Inc. Cabin John, MD). Os dois compartimentos da microcâmara foram separados por membrana de policarbonato (5µm Milipore Corp., Bedford, MA). Posteriormente a lectina (0,4; 7; 15 e 31 µg/poço) em 28 µL de RPMI, foi adicionada nos poços da parte inferior da câmara e 50 µL da suspensão de neutrófilos ( $10^6$  cels/mL) nos poços da parte superior desta. A câmara foi deixada em incubação por 60 minutos em estufa de CO<sub>2</sub> e em seguida, o filtro foi lavado cuidadosamente com PBS com a finalidade de se retirar as células que não migraram. Esse filtro foi fixado em metanol a 70% e corado com a utilização de um corante rápido HEMA 3. Os neutrófilos que migraram foram quantificados por microscopia óptica usando-se objetiva de imersão (aumento de 100 X), a contagem foi feita em cinco campos aleatórios para cada poço de um total de 6 poços por grupo experimental segundo metodologia descrita por Boyden, 1962. Em cada experimento, RPMI foi utilizado como controle negativo (migração randômica) e IL-8 (10 ng/mL) como controle positivo.

### **5.7. Análise Estatística**

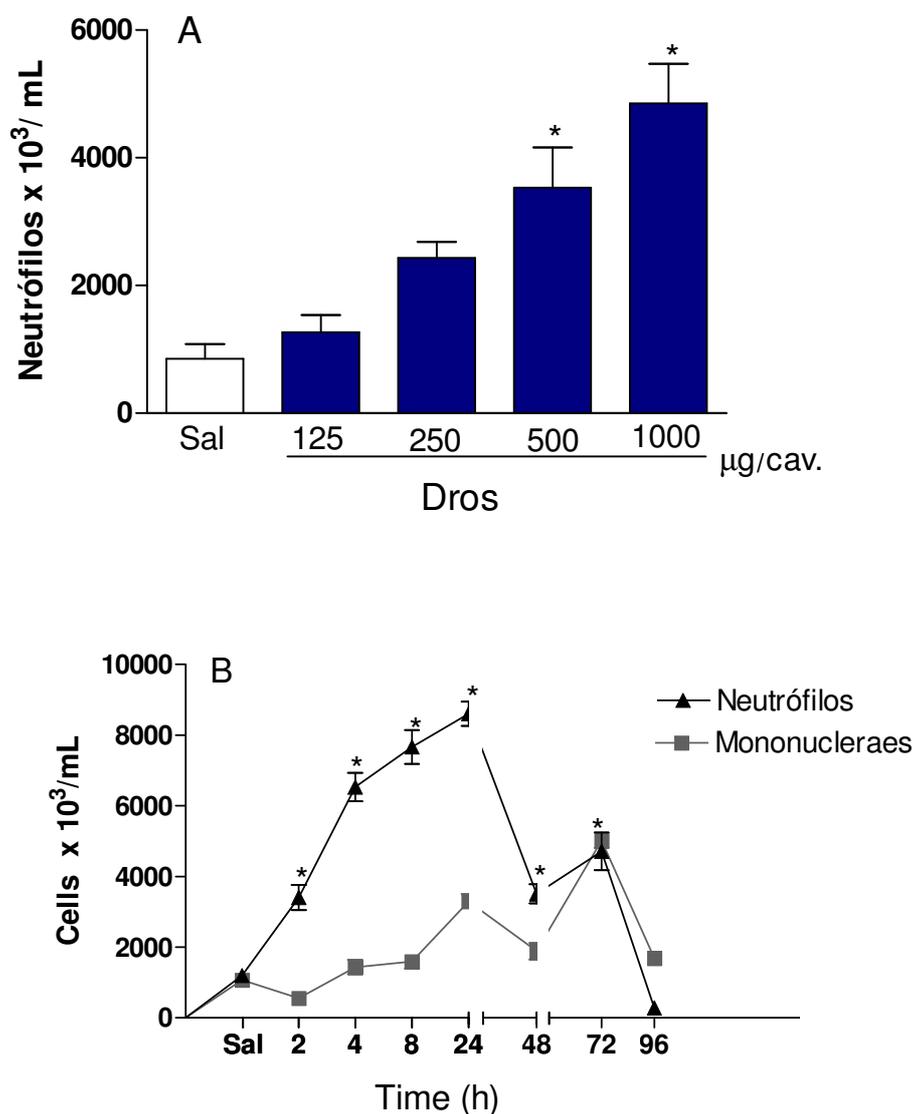
Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M.. Para a determinação das diferenças estatísticas entre os grupos, os testes utilizados foram: Análise de Variância (ANOVA) e teste de Bonferroni ou teste t não pareado. Para indicar significância estatística foi fixado  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1. No modelo de peritonite em ratos a lectina de *Dioclea rostrata* induz migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de forma dose-e tempo-dependente.

A administração i.p. da lectina de sementes de *Dioclea rostrata* (Dros) induziu migração de neutrófilos, de forma significativa, para a cavidade peritoneal na 4<sup>a</sup> hora após sua injeção. (Fig. 4 A). A lectina apresentou efeito pró-inflamatório crescente nas doses de 500 e 1000 µg/cavidade, promovendo um aumento na migração de neutrófilos de 314 e 470% respectivamente, quando comparado ao grupo controle (Sal). A partir destes resultados a dose de 500 µg/cavidade foi adotada para os demais experimentos.

Com o intuito de investigar o curso temporal da atividade pró-inflamatória da lectina, a migração de neutrófilos foi avaliada 2, 4, 8, 24, 48, 72 e 96 horas após a injeção da Dros (Fig. 4 B). Pode-se observar que a lectina induziu um aumento significativo do número de neutrófilos no fluído peritoneal a partir da 2<sup>a</sup> hora sendo o valor máximo observado na 24<sup>a</sup> hora, retornando aos níveis basais somente na 96<sup>a</sup> hora após sua administração.



**Figura 4. Lectina de Dros induz migração de neutrófilos de forma dose- e tempo dependente.** Painel A: Os animais foram tratados i.p. com 1 mL de Dros (125, 250, 500 e 1000 µg). Os animais controle (Sal) receberam o mesmo volume de salina estéril i.p. e a migração de neutrófilos avaliada após 4 horas. Painel B: Dros (500 µg) foi injetada i.p. e a migração de leucócitos foi determinada 2, 4, 8, 24, 48, 72 e 96 horas após. Valores expressos como média ± E.P.M. de 6 animais. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo Sal. ANOVA - Bonferroni.

## **6.2. $\alpha$ -metil-D-manosídeo inibe a atividade pró-inflamatória da Dros**

Este experimento foi realizado no sentido de abordar o envolvimento do domínio lectínico na resposta inflamatória induzida pela lectina utilizada. Desta forma foi utilizada Dros (500  $\mu$ g/cavidade) associada com 0,2 M de seu açúcar ligante,  $\alpha$ -metil-D-manosídeo. Na figura 5 constatou-se que a administração da lectina associada com o açúcar ligante provocou uma inibição da migração de neutrófilos na cavidade peritoneal de 47%, quando comparado ao grupo no qual a lectina foi injetada sozinha.

## **6.3. Desnaturação térmica reverte o efeito pró-inflamatório da lectina de *Dioclea rostrata*.**

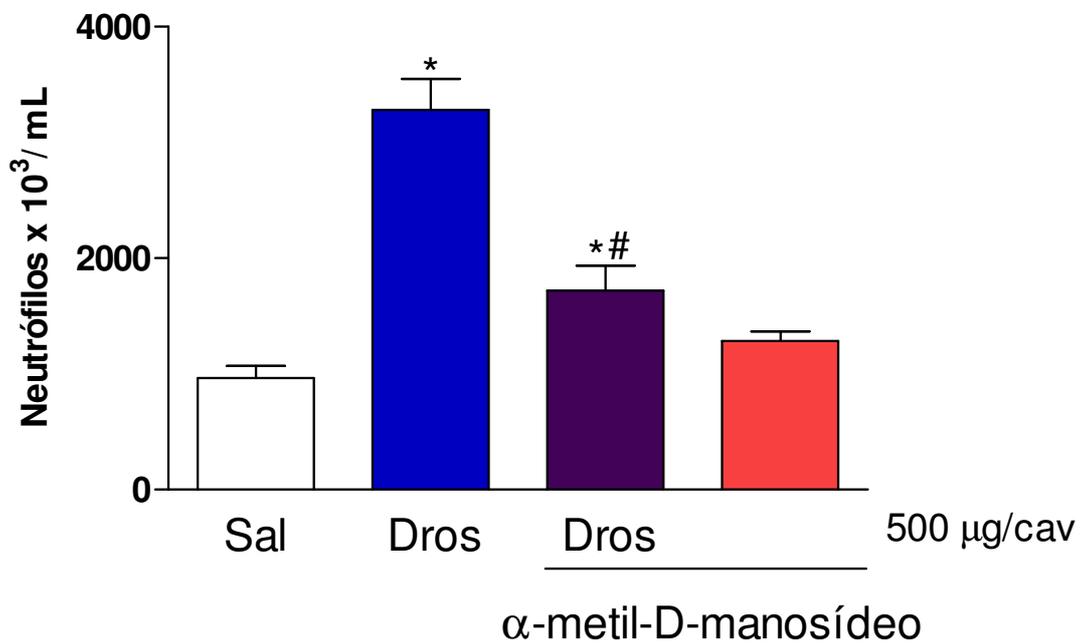
Para realizar uma investigação do papel da estrutura tridimensional da Dros no seu efeito pró-inflamatório foi realizado o tratamento térmico desta proteína a 100  $^{\circ}$ C por um período de 30 minutos antes de sua administração. Na figura 6 fica evidenciado que a Dros (500 $\mu$ g/cavidade) desnaturada não induz migração de neutrófilos, quando comparado a lectina não integrada.

## **6.4. Indometacina, Talidomida e Dexametasona inibem a migração de neutrófilos induzida pela Dros.**

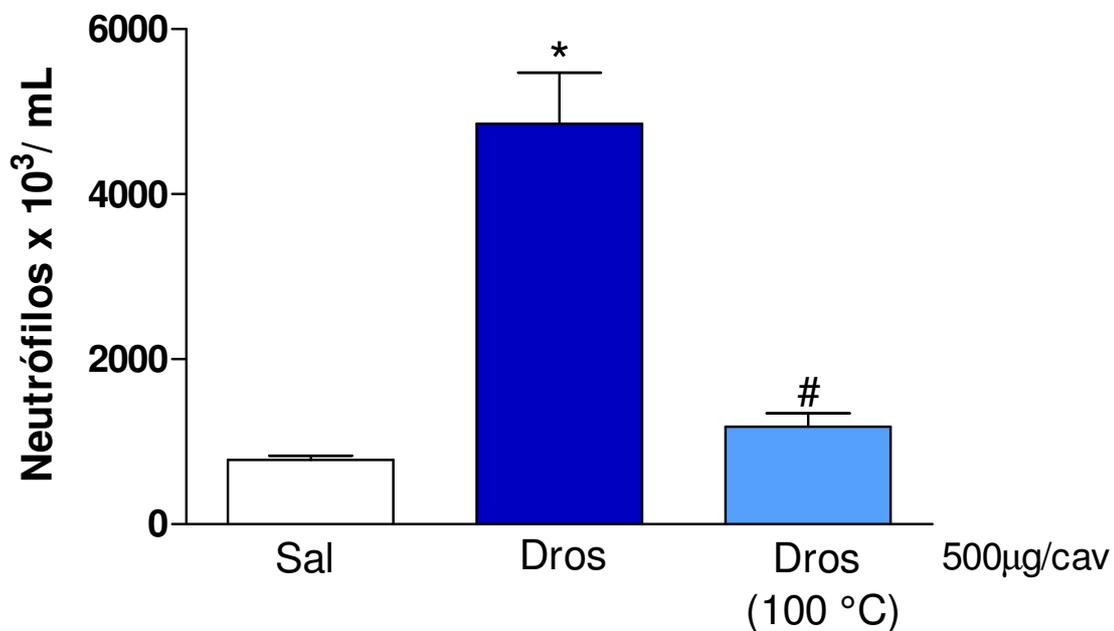
Para investigarmos os possíveis mediadores químicos envolvidos na atividade pró-inflamatória da lectina realizamos o pré-tratamento dos animais com bloqueadores farmacológicos de alguns mediadores.

Na tabela 2 fica evidenciado que a indometacina (5mg/Kg; s.c.), um inibidor inespecífico das cicloxigenases 1 e 2 (COX 1 e COX2), talidomida (80 mg/Kg; s.c.) um inibidor específico de TNF- $\alpha$  e dexametasona (1 mg/Kg; s.c.) um glicocorticóide com varias atuações antiinflamatórias, inibiram significativamente a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida pela lectina. A inibição pela indometacina foi de 36%, talidomida 53% e dexametasona de 56%, comparado aos animais que receberam somente lectina. Por outro lado, o tratamento dos animais

com MK 886, um inibidor da lipoxigenase; PCA, inibidor do fator de agregação plaquetária; meclizina um anti-histamínico; pentoxifilina, inibidor inespecífico de TNF- $\alpha$ ; e celecoxibe, inibidor seletivo da COX-2, não produziram nenhum efeito inibitório sobre a migração de neutrófilos induzida pela lectina.



**Figura 5. Bloqueio do domínio lectínico da Dros com  $\alpha$ -metil-D-manosídeo inibe o seu efeito pró-inflamatório na cavidade peritoneal.** Dros (500 $\mu$ g) foi administrada i.p., sozinha ou em associação com 0,2 M de seu açúcar ligante, o controle negativo recebeu salina estéril. Foi realizado um controle somente com o açúcar. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 horas após e os resultados expressos como a média  $\pm$  E.P.M. de 6 animais. \*  $p < 0,05$  comparado ao grupo salina. #  $p < 0,05$  comparado ao grupo que recebeu apenas Dros.



**Figura 6. Desnaturação térmica reverte o efeito pró-inflamatório da lectina de Dros.** A lectina, íntegra ou desnaturada pelo tratamento a 100 °C por 30 minutos, foi administrada por via i.p. (500 µg). A migração de neutrófilos foi avaliada 4 horas após a administração da lectina. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. de 6 animais. \*  $p < 0.05$  comparado ao grupo tratado com salina (Sal), # $p < 0.05$  comparado ao grupo tratado com Dros não desnaturada. ANOVA- Bonferroni.

Tratamento	Dose	Migração de neutrófilos
Salina estéril	1 mL/cav; i.p.	1.219 ± 1.8
Dros	500 µg/cav; i.p.	5.018 ± 5.9 **
Dros + Meclizina	40 mg/Kg; s.c.	4.214 ± 2.6
Dros + Celecoxibe	30 mg/Kg; s.c.	4.070 ± 4.6
Dros + PCA	10 mg/Kg; s.c.	4.605 ± 2.2
Dros + MK 886	1 mg/Kg; v.o.	4.876 ± 1.6
Dros + Pentoxifilina	100 mg/Kg; s.c.	4.116 ± 2.3
Dros + Indometacina	10 mg/Kg; s.c.	3.195 ± 3.1*
Dros + Talidomida	200 mg/Kg; s.c.	2.353 ± 2.3*
Dros + Dexametasona	2 mg/Kg; s.c.	2.168 ± 2.4*

**Tabela 2. Efeito de diferentes bloqueadores farmacológicos na migração de neutrófilos induzida por Dros na cavidade peritoneal.** Pré-tratamento com indometacina, talidomida, dexametasona, mas não com meclizina, celecoxibe, pentoxifilina, MK 886 e PCA inibiram a migração de neutrófilos induzida pela Dros. Os resultados reportam a média ± E.P.M. de 6 animais. \* p < 0,05 comparado ao grupo Dros, \*\* p < 0,05 comparado ao grupo salina. ANOVA - Bonferroni

## **6.5. Mudanças da população de células peritoneais residentes alteram a atividade pró-inflamatória da lectina de *Dioclea rostrata*.**

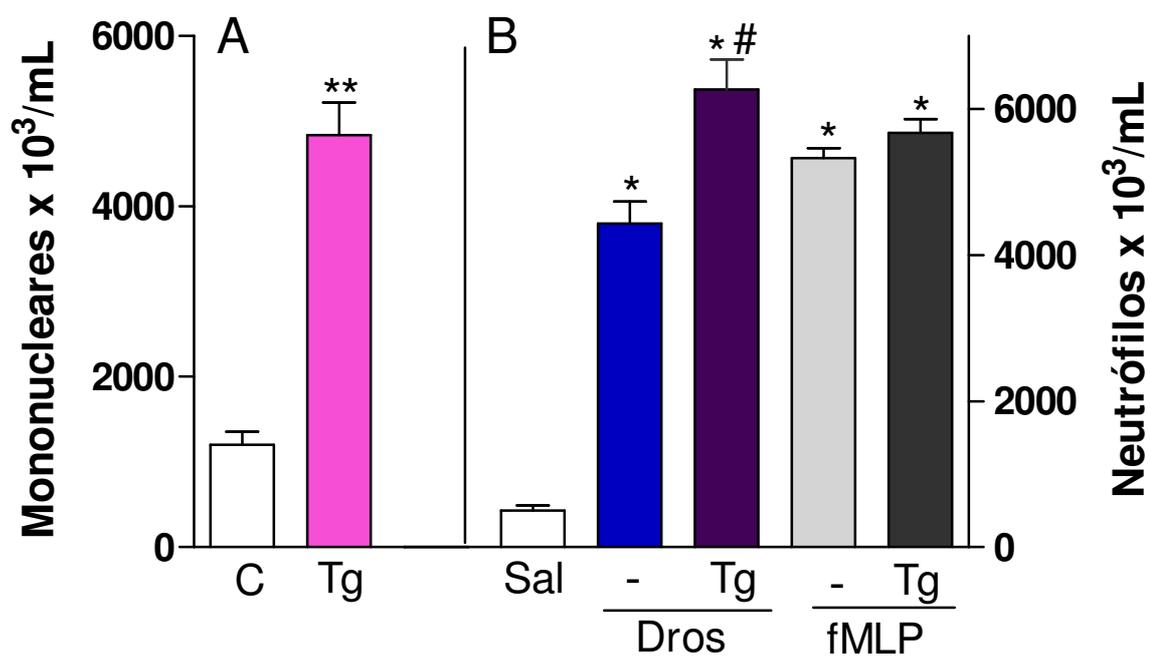
O aumento do número de macrófagos, mas não a depleção de mastócitos modifica a atividade pró-inflamatória da Dros, através dos seguintes resultados:

### **6.5.1. A migração de neutrófilos induzida pela lectina de *Dioclea rostrata* foi potenciada pelo aumento da população de macrófagos residentes em ratos.**

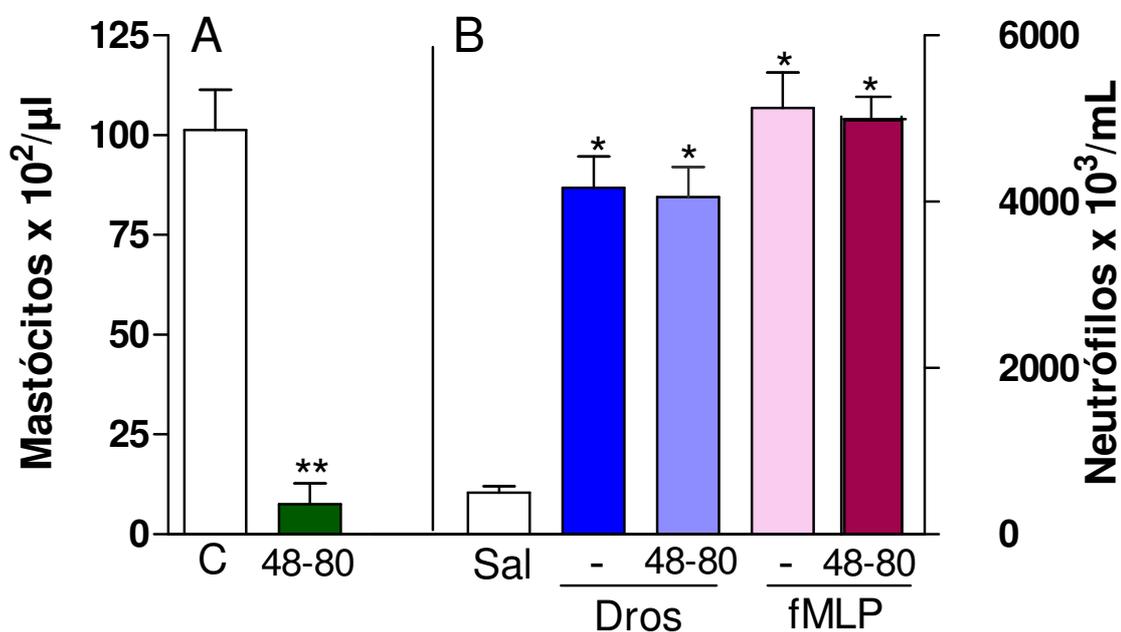
Através do tratamento com tioglicolato (3% i.p.) quatro dias antes da administração da lectina, a população de macrófagos da cavidade peritoneal foi incrementada 303% em relação ao grupo controle (C), (figura 7A). Pode-se observar na figura 7B que o incremento de macrófagos acarretou um aumento de 49% na migração de neutrófilos induzida pela Dros (500 µg/cav.) quando comparado ao grupo controle. Entretanto o efeito quimiotático do fMLP ( $10 \times 10^{-9}$  moles/cavidade) não foi alterado pelo aumento da população de macrófagos.

### **6.5.2. A depleção da população de mastócitos não altera a migração de neutrófilos induzida pela lectina de *Dioclea rostrata* em ratos.**

A depleção de mastócitos residentes na cavidade peritoneal através do pré-tratamento crônico dos animais com o composto 48/80 foi de 92% em relação ao grupo controle (C) (figura 8A). Este procedimento não interferiu na migração de neutrófilos induzida pela lectina, bem como do fMLP ( $10 \times 10^{-9}$  moles/ cav.). Este dado sugere que os mastócitos não estão envolvidos na migração de neutrófilos induzida pela Dros.



**Figura 7. O aumento da população de macrófagos na cavidade peritoneal potencia a migração de neutrófilos induzida pela lectina de Dros.** Painel A: número de macrófagos do grupo controle (C) e dos animais tratados com tioglicolato (Tg; 3% v/v; 10 mL i.p.). Painel B: migração de neutrófilos em animais tratados por salina (Sal, 1 mL), Dros (500 µg), fMLP ( $10 \times 10^{-9}$  moles), nas cavidades pré-tratadas com Tg ( - ) ou não. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após a injeção dos estímulos. O resultados foram expressos como a média  $\pm$  E.P.M. do número de mononucleares ou neutrófilos em 6 animais. \*\*  $p < 0.05$  comparado a C; \*  $p < 0.05$  comparado a Sal. #  $p < 0.05$  comparado ao grupo Dros não tratado com tioglicolato. ANOVA – Bonferroni.



**Figura 8. A depleção de mastócitos da cavidade peritoneal não altera a migração de neutrófilos induzida pela lectina de Dros.** Painel A população de mastócitos em ratos controles (C) e pré-tratados com composto 48/80. painel B: migração de neutrófilos induzida em animais tratados com: salina (Sal, 1 mL i.p.), Dros (500 μg/cav.), nas cavidades tratadas ou não com 48/80 ( - ). A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após a injeção dos estímulos. Os resultados foram expressos como a média ±E.P.M. de mastócitos e neutrófilos de 6 animais. \*\* p< 0.05 comparado ao grupo C e \* p< 0.05 comparado ao grupo Sal. ANOVA – Bonferroni.

## **6.6. Macrófagos estimulados com Dros *in vitro*, liberam substância quimiotática para neutrófilos.**

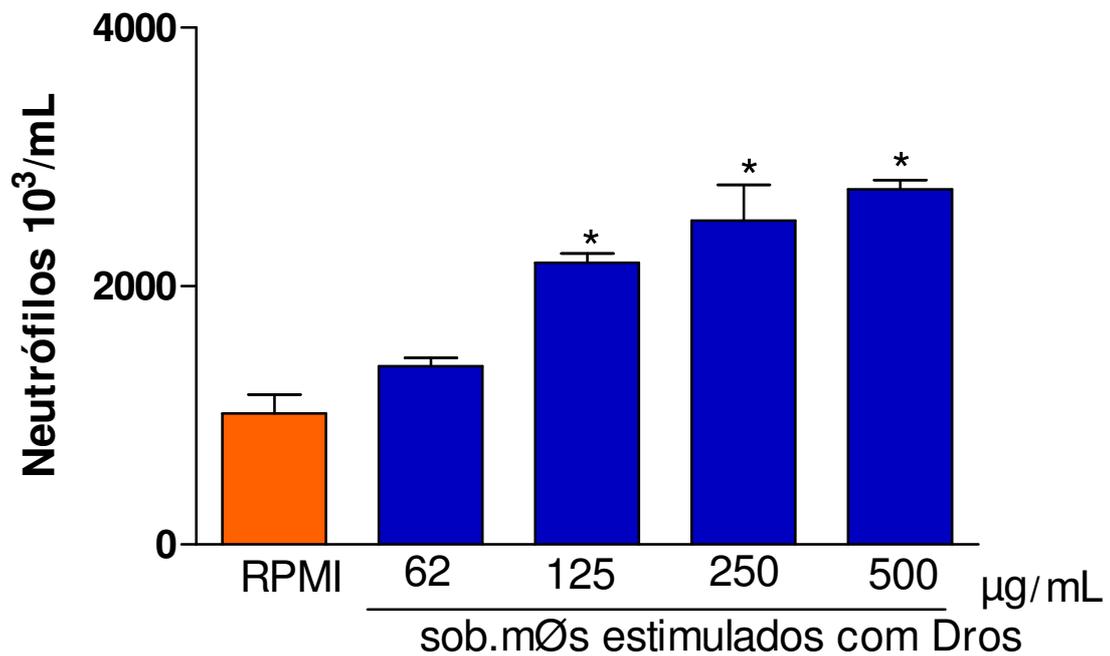
Na figura 9 observa-se que a Dros foi capaz de estimular a cultura de macrófagos de 12 horas a liberarem no seu sobrenadante uma substância quimiotática para neutrófilos. As doses utilizadas foram de 62, 125, 250 e 500 µg/mL. Os sobrenadantes dos macrófagos estimulados com a Dros nas doses citadas, quando injetados na cavidade peritoneal dos animais provocaram um aumento de 114%, 146% e 170% respectivamente, no número de neutrófilos 4 horas após a administração. Os percentuais foram considerados em relação aos animais administrados i.p. com o sobrenadante de macrófagos não estimulados.

### **6.6.1. Lectina de *Dioclea rostrata* induz liberação de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-10.**

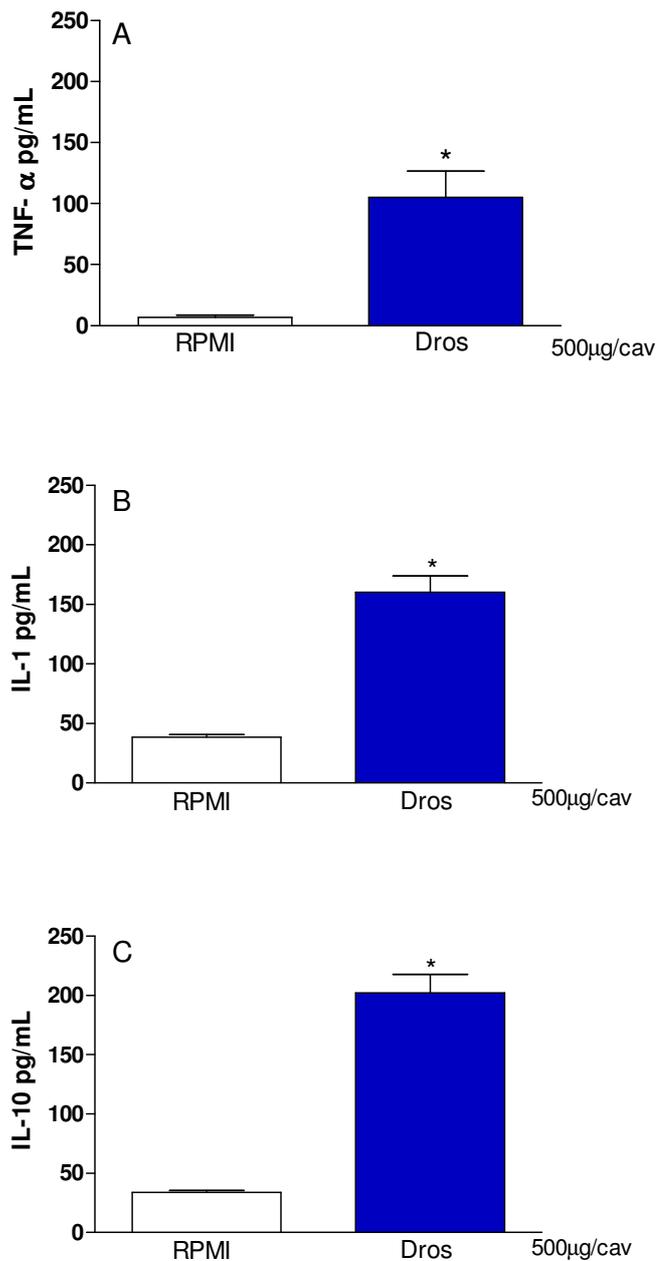
Na figura 10 observa-se que os níveis de TNF- $\alpha$  estão aumentados no grupo tratado com a lectina em relação ao grupo controle. A IL-1 apresentou um aumento de 416% e a IL-10 (citocina anti-inflamatória) apresentou um aumento de 597% em relação ao grupo controle.

## **6.7. No modelo de bolsa de ar subcutânea (“Air pouch”) a lectina de *Dioclea rostrata* induz migração de neutrófilos**

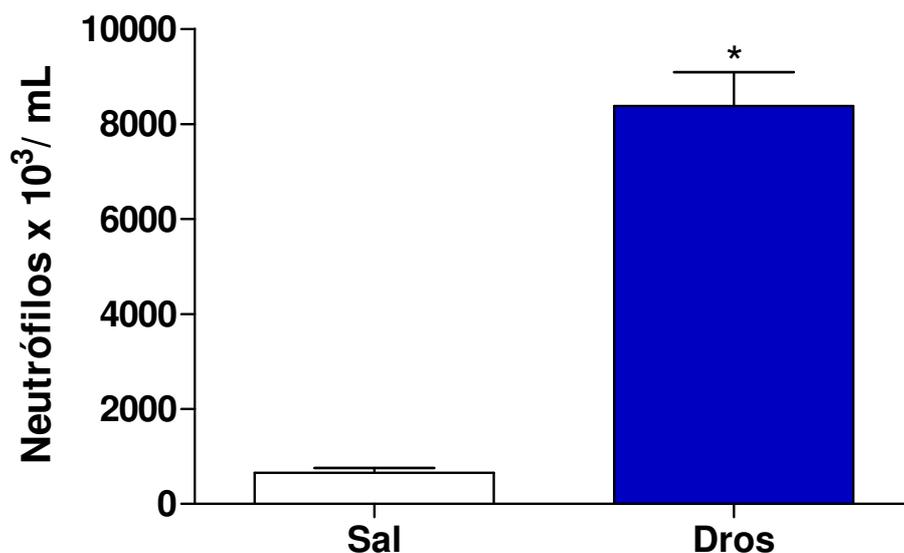
Observou-se o efeito quimiotático para neutrófilos da lectina no modelo de bolsa de ar subcutânea, onde se reproduz uma cavidade artificial com predomínio de macrófagos residentes, na qual a lectina foi injetada. Conforme demonstrado na figura 11, verificou-se que a lectina (500µg /bolsa) promoveu um aumento de 1.275% do número de neutrófilos em relação ao controle (Sal).



**Figura 9. O sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados com a lectina de Dros induz migração de neutrófilos.** Macrófagos em cultura de 12 h foram estimulados com Dros (125, 250 e 500 µg/mL) durante 60 minutos. O sobrenadante liberado pelos macrófagos foi administrado i.p. em animais normais. A avaliação da migração de neutrófilos foi realizada após 4 horas. Os animais controles receberam apenas o sobrenadante de macrófagos não estimulados (RPMI). Os resultados foram expressos como média ± E.P.M. do número de neutrófilos de 6 animais. \*  $p < 0.05$  comparado a RPMI. ANOVA- Bonferroni.



**Figura 10. Lectina de Dros aumenta os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-10 no sobrenadante da cultura de macrófagos.** O sobrenadante liberado na cultura de macrófagos estimulado pela Dros (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi administrado i.p. em animais normais. Quatro horas após a injeção foi recolhido o exsudato peritoneal e realizada as dosagens das citocinas. Painel A: Níveis de TNF- $\alpha$ . Painel B: Níveis de IL-1. Painel C: Níveis de IL-10. Os animais controle receberam somente RPMI. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. de 6 animais. \*  $p < 0.05$  comparado a controle. ANOVA – Teste t não pareado.



**Figura 11. A lectina de Dros induz migração de neutrófilos no modelo de bolsa de ar subcutânea.** Dros (500 µg) ou Salina (1ml) foram administradas na bolsa de ar formada durante 6 dias. A avaliação de neutrófilos foi realizada 6 horas após a injeção da lectina ou Salina (Sal). Os animais controle (Sal) receberam somente salina estéril (1mL/bolsa). \* p<0.05 comparado a Sal. ANOVA – Teste t não pareado.

### 6.8. Lectina de *Dioclea rostrata* induz efeito edematogênico

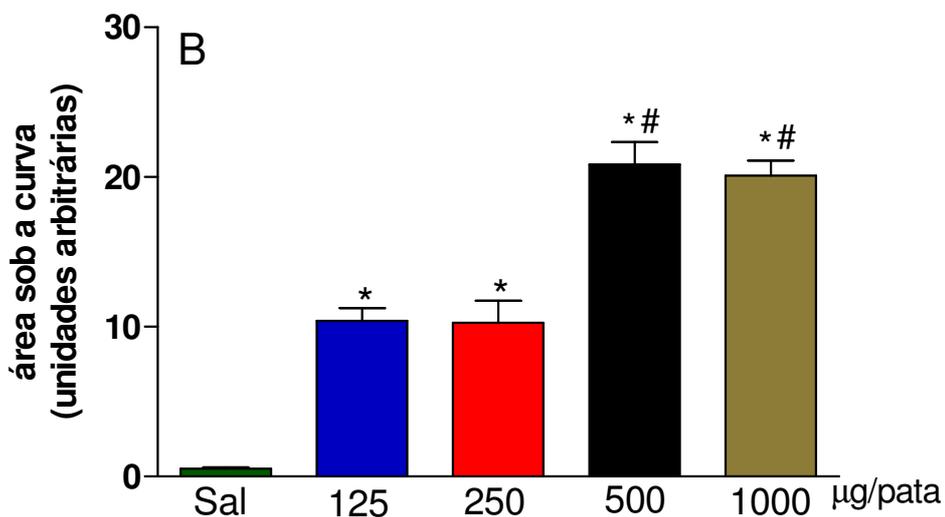
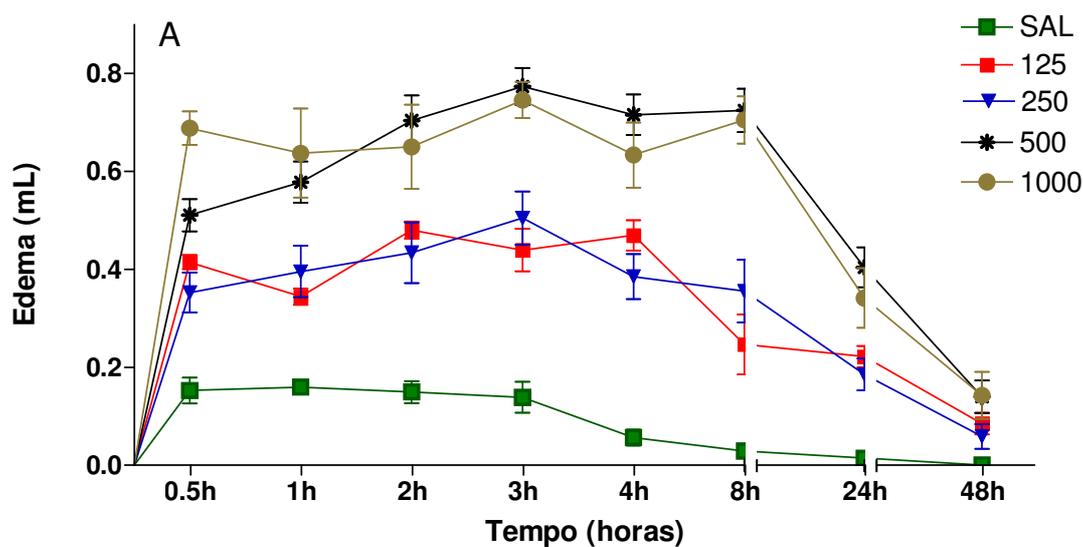
Avaliou-se o efeito da lectina *Dioclea rostrata* no modelo de edema de pata em ratos. A figura 12 mostra que a Dros administrada por via subcutânea intraplantar nas patas direitas dos animais produziu edema crescente.

A Lectina mostrou-se eficiente em todas as doses administradas (125, 250, 500 e 1000 µg/pata) produzindo um aumento de até 1900% do volume de líquidos deslocados pelas patas.

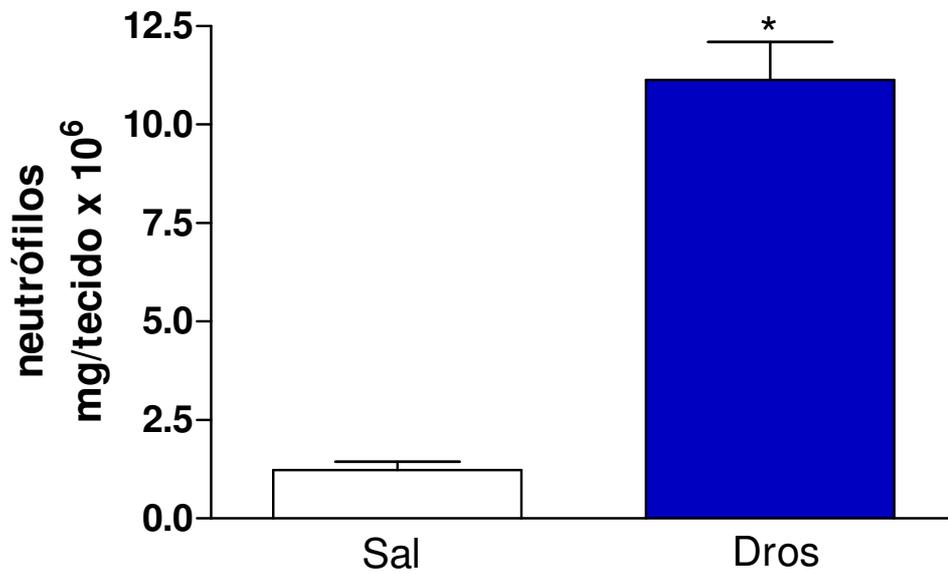
Na investigação do curso temporal de edema induzido pela Dros (fig. 13 A) foi observado um pico inicial aos 30 minutos após a administração da lectina e um pico máximo na 4ª hora, seguidos de um decréscimo. Após 48 horas de avaliação o edema decresceu, retornando aos valores basais.

#### **6.8.1. O edema de pata induzido pela lectina de *Dioclea rostrata*, apresenta infiltração de neutrófilos**

A figura 13 mostra que a administração da Dros na dose de 500 µg/pata foi capaz de causar um aumento significativo de 827% no número neutrófilos nas patas dos animais, quantificados 4 horas após a indução do edema, através da medida da mieloperoxidase, quando comparada aos animais que receberam somente salina.



**Figura 12. Lectina de Dros induz edema de pata.** Painel A: Salina estéril (0,1mL) ou Dros nas doses de 125, 250, 500 e 1000 µg/pata, foi injetada nas patas direitas dos animais, por via s.c. intraplantar. O edema foi medido ½, 1, 2, 3, 4, 8, 24 e 48 horas após a injeção da lectina, sendo expresso em mL. Painel B: área sob a curva da variação de volume de cada animal, foi calculado pelo método trapézio (LANDUCCI, *et al.*, 1995). Cada barra representa a média ± E.P.M. de 6 animais. \*  $p < 0.05$  comparado ao grupo de animais que receberam somente salina (Sal); \*  $p < 0.05$  comparado ao grupo que recebeu a dose de 125 e 250 µg/pata. - ANOVA-Bonferroni.

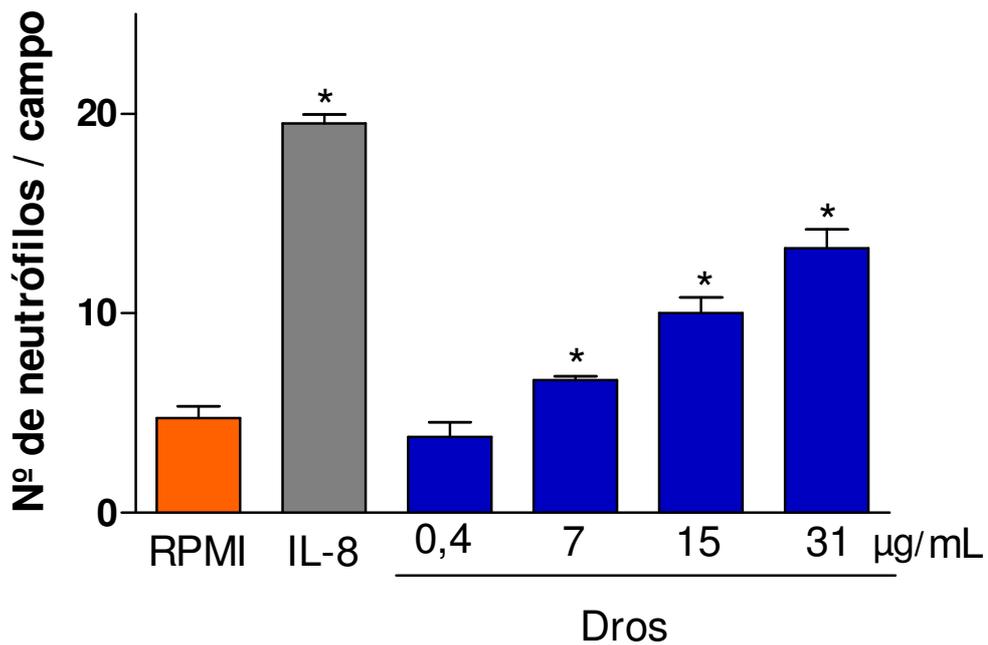


**Figura 13. Lectina de Dros aumenta a atividade da MPO na pata dos animais.**

O edema foi induzido nas patas dos animais através da injeção subplantar da Dros (500 µg/pata). O material analisado foi retirado na 4<sup>a</sup> hora e armazenado para posterior dosagem de MPO. Os animais controle (Sal) receberam somente salina estéril. \*  $p < 0.05$  comparado a Sal. ANOVA – Teste t não pareado.

### **6.5. Lectina de Dioclea rostrata induz quimiotaxia de neutrófilos *in vitro* de forma dose-dependente.**

Através dos dados apresentados na figura 14 observa-se que a Dros (15, 31, e 500  $\mu\text{g}/\text{poço}$ ), quando incubada com neutrófilos humanos em microcâmara de 48 poços induz quimiotaxia destas células de forma dose-dependente. A IL-8 foi utilizada como controle positivo do experimento.



**Figura 14. Lectina Dros induz quimiotaxia de neutrófilos *in vitro*.** Dros (0,4; 7; 15; 31 µg/poço), foi utilizada como agente quimiotático em microcâmaras de 48 poços. Os resultados foram expressos como a média ± E.P.M. do número de neutrófilos por campo de um total de cinco campos por poço (6 poços por grupo). RPMI e IL-8 foram utilizados, respectivamente, como controles negativo e positivo. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo RPMI. ANOVA - Bonferroni

## 7. DISCUSSÃO

O potencial natural encontrado nos países latino-americanos principalmente no Brasil, aliado à diversidade de compostos bioativos encontrados, especialmente nas plantas superiores, têm atraído a atenção da comunidade científica e das indústrias farmacêuticas (CALIXTO *et al.*, 2005).

A lectina de *Dioclea rostrata* (Dros) foi capaz de induzir a migração de neutrófilos e mononucleares para a cavidade peritoneal de ratos, de forma dose e tempo-dependente. O padrão celular na cavidade peritoneal após a administração da lectina, foi característico de um processo inflamatório agudo, com um influxo de neutrófilos nas primeiras horas e valores máximos na 24<sup>a</sup> hora, retornando aos níveis basais na 96<sup>a</sup> hora. O curso temporal da migração de mononucleares ocorreu inversamente aquele verificado para neutrófilos, ao tempo em que os neutrófilos apresentavam declínio, os mononucleares aumentavam. Estes dados conferem com outras lectinas como a lectina de *Vatairea macrocarpa* (lectina de leguminosa que apresentou efeitos inflamatórios) com mesmo comportamento diferenciando-se apenas da concentração utilizada.

Os efeitos da lectina do presente estudo parecem ser dependentes do sítio de reconhecimento de carboidratos, uma vez que a pré-incubação da Dros com o seu monossacarídeo ligante específico ( $\alpha$ -metil-D-manosídeo), preveniu em 47% o efeito no modelo de peritonite. O tratamento dos animais com a lectina, associada a seu carboidrato ligante reverteu os estimuladores apresentados pela na migração de neutrófilos induzida pela Dros, apontando envolvimento de carboidratos na atividade biológica demonstrada por esta lectina. Destaca-se que  $\alpha$ -metil-D-manosídeo, quando administrado i.p. não desencadeia nenhum efeito sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Sendo assim ficou evidente que o efeito estimulador sobre a migração destas células deve ocorrer através da interação entre os domínios lectínicos presentes na Dros com receptores glicídeos localizados na membrana das células inflamatórias.

De posse de todos estes achados, investigou-se a importância da estrutura tridimensional da proteína para a função biológica, para tanto foi alterada a estrutura da lectina através de desnaturação, realizada com aquecimento. Observou-se que a desnaturação da proteína bloqueou o efeito na migração de neutrófilos no modelo de peritonite. Esses achados estão de acordo com a literatura, onde já foi demonstrado

que a estrutura tridimensional destas proteínas é de grande importância para o exercício de suas funções pró-inflamatórias (ALENCAR, et al.; 1999))

Para melhor investigação do mecanismo de ação da Dros foi realizada uma modulação farmacológica da migração de neutrófilos induzida pela lectina para a cavidade peritoneal. Dentre as drogas utilizadas a indometacina, dexametasona, e talidomida, foram as que inibiram a migração de neutrófilos induzida pelo Dros.

A indometacina é um inibidor não específico da atividade de ambas isoformas da cicloxigenase (COX-1 e COX-2), enzima responsável pela metabolização do ácido araquidônico com conseqüente produção de prostaglandinas (KANKURI *et al.*, 2001). Além desta ação, ela inibe a mobilidade dos leucócitos polimorfonucleares e a proliferação de células endoteliais, um aspecto relevante para sua ação antiangiogênica (PARK *et al.*, 2000). Considerando-se que o efeito pró-inflamatório da Dros não foi afetado pelo tratamento com o celecoxibe (inibidor específico de COX2) e sim com a indometacina, podemos assim referir que somente a COX1 está envolvida neste processo.

A dexametasona é descrita como um glicocorticóide sintético com várias atuações antiinflamatórias e imunossupressoras, dentre elas, destaca-se a inibição da expressão de moléculas de adesão e de várias enzimas lisossomais que produzem mediadores que participam do processo inflamatório, como a fosfolipase A<sub>2</sub>, cicloxigenase-2 induzida e óxido nítrico sintase induzida, além de inibir a síntese, liberação e ação de várias citocinas pró-inflamatórias (KIM *et al.*, 2003)

A talidomida atua sobre a produção de TNF- $\alpha$  através do aumento da degradação de seu RNA mensageiro, sem afetar a produção de outras citocinas (MOREIRA *et al.*, 1993). Os resultados obtidos pelo tratamento com dexametasona e talidomida sobre a migração de neutrófilos induzida pela Dros, levam a consideração do envolvimento de citocinas, incluindo TNF-  $\alpha$ , na atividade pró-inflamatória da lectina. Por outro lado, o envolvimento de lipoxigenases, PAF e histamina, pode ser descartado considerando-se que o tratamento dos animais com as drogas inibidoras da liberação destes mediadores, foi ineficiente em inibir o efeito pró-inflamatório da Dros.

Com o intuito de observamos a participação de células residentes, principalmente macrófagos e mastócitos na atividade inflamatória induzida pela

lectina, foram feitas modificações na população destas células na cavidade peritoneal, através de metodologias já estabelecidas pela literatura científica.

Quando a população de macrófagos da cavidade peritoneal foi potenciada pelo tratamento dos animais com tioglicolato, observou-se um aumento significativo da resposta inflamatória induzida pela Dros. O envolvimento da participação de macrófagos na migração de neutrófilos induzida pela lectina também se confirmou no modelo de bolsa de ar subcutânea, onde segundo a literatura, se obtém uma cavidade criada artificialmente com uma população celular formada exclusivamente por fibroblastos e células do tipo macrófagos (RIBEIRO *et al.*, 1991). Neste modelo, a Dros promoveu uma migração de neutrófilos de forma muito mais intensa do que àquela demonstrada no modelo de peritonite.

A função dos macrófagos se baseia principalmente na fagocitose. Em áreas de inflamação, os macrófagos ingerem restos teciduais e células mortas. Estas células respondem tipicamente aos microrganismos quase tão rapidamente quanto os neutrófilos, mas persistem por muito mais tempo no local da inflamação (ROBINS *et al.* 2004).

Mastócitos se distribuem amplamente nos tecidos conjuntivos e participam das reações inflamatórias agudas e persistentes. Reconhecem antígenos específicos, e liberam mediadores a partir de seus granulos, como a histamina e produtos da oxidação de AA, LTB<sub>4</sub> que apresentam atividade quimiotática para neutrófilos (ROBINS *et al.*; 2004).

Com o intuito de investigar o papel de mastócitos na resposta inflamatória da Dros, o número destas células foi reduzido em 92% pela utilização da droga, o composto 48/80 (OHTA *et al.*, 2003). Quando a lectina foi injetada i.p., a redução de mastócitos não afetou a migração de neutrófilos induzida pela Dros. A partir deste resultado, ficou evidente que diferente dos macrófagos, os mastócitos não estão envolvidos no recrutamento de neutrófilos induzido pela Dros e que pelo menos parte da resposta inflamatória induzida pela Dros é dependente de macrófagos.

Em posse dos resultados obtidos até este momento do trabalho, pode-se especular o importante papel de macrófagos e de citocinas na resposta inflamatória induzida pela Dros. Então, a demonstração de que a Dros, quando incubada com cultura de macrófagos, foi capaz de induzir a liberação de fatores quimiotáticos por

estas células, confirmou a hipótese levantada anteriormente de que o efeito ativador da migração de neutrófilos induzida pela Dros é dependente da interação desta lectina com macrófagos, provavelmente através da ligação com receptores de membrana elicitando assim a liberação/síntese de fatores quimiotáticos como as citocinas.

Macrófagos são células hábeis em liberar diversas citocinas pró-inflamatórias entre elas IL-1, TNF- $\alpha$ , e IL-8. O TNF- $\alpha$  é uma potente citocina pró-inflamatória, rapidamente produzida em grandes quantidades em resposta a estímulos inflamatórios e considerada uma citocina inflamatória primária, devido seu papel de iniciar a cascata de ativação de outras citocinas. A citocina inflamatória IL-1 é produzida e secretada sobre condições patológicas associadas a neuropatias, crescimento tumoral e doenças inflamatórias crônicas como artrite reumatóide (SOMMER *et al.*, 2004).

É sabido na literatura que citocinas como a IL-10 são liberadas tardiamente no processo inflamatório produzidas em determinadas magnitudes em resposta ao agente agressor, limitando as conseqüências deletérias causadas da ação prolongada de citocinas pró-inflamatórias (VERRI *et al.*, 2006, ASSREUY 2002, 2003). A secreção acontece somente após a secreção de citocinas pró-inflamatórias e assim age como um freio regulador da inflamação. Neste estudo procurou considerar o efeito da Dros na síntese/liberação de citocinas, pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1, e se a resposta inflamatória induzida pela Dros poderia está sendo controlada através de um “feedback” negativo *via* liberação de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10. Os elevados níveis de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-10 no exsudato peritoneal de animais tratados com Dros confirmou a hipótese de que a Dros quando administrada i.p. provoca a liberação de uma cascata de citocinas, provavelmente iniciada pela liberação de citocinas pró-inflamatória, sendo esta resposta regulada pouco tempo depois pela liberação de citocinas inibitórias.

Apesar de grandes avanços terem ocorrido para a compreensão dos mediadores endógenos e seus papéis na resposta inflamatória, um longo caminho ainda deve ser percorrido para que se entendam os complexos mecanismos fisiopatológicos dessa resposta. Está claro, na literatura, que mediadores como TNF- $\alpha$  e IL-1 tem papéis fundamentais na inflamação, e que os mediadores antiinflamatórios estão presentes, concomitantemente, modulando os efeitos e a

liberação dos mediadores inflamatórios. A relação desses mediadores é fundamental para a evolução ou resolução do processo, porém o fator determinante para uma direção, ou para outra, não está claro ainda hoje. Deste modo, as citocinas estão sendo cada vez mais utilizadas em situações clínicas e em modelos animais para estimular ou inibir inflamação, imunidade e hematopoese. A partir destes resultados sugere-se que a lectina de *Dioclea rostrata* seja estudada de forma mais intensa para que seja usada como um marcador no estudo das citocinas e provavelmente seja utilizada desenvolvendo um papel regulador destas citoninas.

A atividade pró-inflamatória da Dros também foi confirmada no modelo de edema de pata, a lectina em questão apresentou atividade edematogênica de forma dose- e tempo-dependentes. Já foi demonstrado que o edema de pata induzido por carragenina envolve uma complexa liberação, tempo-dependente de mediadores inflamatórios (AL-SWAYEH *et al.*, 2000). A resposta inflamatória na fase inicial é devida principalmente à liberação de aminas biogênicas como histamina, bradicinina e serotonina, o óxido nítrico (NO) também é encontrado nesta fase, sendo formado pela isoforma neuronal da enzima NO sintase (nNOS). E na fase tardia, a resposta inflamatória é devida a formação de prostanoídes pró-inflamatórios e NO na sua isoforma induzida (iNOS) (AL-SWAYEH *et al.*, 2000). Neste trabalho observou-se que o tratamento com a lectina induziu um intenso edema que pode ser atribuído ao extravasamento de proteínas plasmáticas, baseado na atividade da enzima mieloperoxidase.

A mieloperoxidase, quando espessa, participa da indução do metabolismo respiratório, evento este importante na fagocitose de microorganismos invasores, como por exemplo: bactérias, vírus e fungos (KLEBANOFF, 1999), bem como células tumorais (WINTERBOURN *et al.*; 2000). Estes resultados indicam que um dos mecanismos de ação pró-inflamatória da Dros deve-se a infiltração de neutrófilos no local da injeção subplantar da Dros. Durante a ativação dos neutrófilos esta enzima é liberada dos fagossomos para o espaço extracelular, onde irá reagir com o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que é derivado do metabolismo respiratório dos neutrófilos, catalisando então a formação de potentes agentes microbicidas como ácido hipocloroso (HOCl) e outras espécies oxidativas (WINTERBOURN; *et al.*; 2000).

Fatores quimiotáticos podem ser produzidos por uma ampla variedade de células, incluindo células endoteliais e epiteliais, macrófagos, monócitos linfócitos e plaquetas, os próprios neutrófilos e células parenquimais (VICENTE-MANZANARES, 2004) Em aprofundamento ao estudo do mecanismo de ação da Dros na inflamação, através do modelo de quimiotaxia *in vitro*, podemos demonstrar que esta proteína também foi capaz de promover migração de neutrófilos interagindo diretamente com esta célula.

Tendo em vista as diversas atividades provocadas por diferentes lectinas em diferentes tipos de células, e a importância da descoberta de novos e eficientes agentes, é de crucial importância tentar estabelecer os mecanismos envolvidos nas ações de lectinas junto ao sistema imune. Através dos resultados obtidos, é possível sugerir que a lectina Dros pode ser utilizada como possível ferramenta não somente em estudos de esclarecimento das vias da resposta inflamatória, mas também como uma molécula com forte potencial de controle da resposta imune. Entretanto, para isso serão necessários estudos adicionais no sentido de melhor caracterizar o seu mecanismo de ação bem como seus mediadores envolvidos.

## 8. CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

1. A lectina de sementes de *Dioclea rostrata* apresenta atividade pró-inflamatória em diferentes modelos experimentais;
2. A atividade pró-inflamatória da Dros parece ser mediada via interação do domínio lectínico com receptores celulares envolvidos na resposta inflamatória;
3. A manutenção da estrutura terciária da Dros é fundamental para sua atividade biológica;
4. A migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida pela Dros ocorre através de um mecanismo indireto, dependente da liberação de citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1, por macrófagos;
5. Na resposta inflamatória induzida pela lectina, parece estar envolvida a ativação de uma cascata de citocinas pró-inflamatórias, que pode estar sendo controlada pela liberação de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10;
6. O efeito edematogênico da lectina ocorre com infiltração de neutrófilos;
7. A Dros é um agente quimotático direto e indireto.

## 9.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; *Imunologia celular e molecular*. 5ª ed. Elsevier Editora LTDA, Rio de Janeiro, 2005.

ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.; HAVT, A.; BENEVIDES, R.G.; DE MOURA, T.R.; DE SOUSA, R.B.; RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q.; CAVADA, B.S.; *Vatairea macrocarpa* (Leguminosae) lectin activates cultured macrophages to release chemotactic mediators. *Naun. Schm. Arch Pharmacol.* v. 374, n. 4, p. 275-282, 2007.

ALENCAR, N.M.N.; CAVALCANTE, C.F.; VASCONCELOS, M.P.; LEITE, K.B.; ARAGÃO, K.S.; ASSREUY, A.M.S.; NOGUEIRA, N.A.P.; CAVADA, B.S.; VALE, M.R.; Anti-inflammatory and anti-microbial effect of lectin from *Lonchocarpus sericeus* seeds in an experimental model of infectious peritonitis. *J. of Pharm. and Pharmacol.* Inglaterra, v. 57, n. 7, p. 919-922, 2005.

ALENCAR, N.M.; ASSREUY, A.M.; CRIDDLE, D.N.; SOUZA, E.P.; SOARES, P.M.; HAVT, A.; ARAGAO, K.S.; BEZERRA, D.P.; RIBEIRO, R.A.; CAVADA, B.S.; *Vatairea macrocarpa* lectin induces paw edema with leukocyte infiltration. *Protein Protein Pept Lett.*, v. 11, n. 2, p. 195-200, 2004.

ALENCAR N.M.N; ASSREUY A.M.; ALENCAR V.B; MELO S.C; RAMOS M.V; CAVADA B.S; CUNHA F.Q; RIBEIRO R.A; The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces *in vivo* neutrophil migration by indirect mechanism. *Int J Biochem Cell Biol.* v .35, n.12, p. 1674-81, 2003.

ALENCAR, N.M.N ; TEIXEIRA, E.H. ; ASSREUY, A.M.S. ; CAVADA, B.S.; FLORES, C.A.; RIBEIRO, R.A.; Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. *Méd. of Inflamm.* Inglaterra, v. 8, p. 107-113, 1999.

AL-SWAYEH, O.A.; CLIFFORD, R.H.; DEL SOLDATO, P.; MOORE, P.K.A.; Comparison of the anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of nitroaspirin and aspirin. *British Journal of Pharmacology.* v. 129, p. 343-350, 2000.

ANDRADE, C.A.; CORREIA, M.T.; COELHO, L.C.; NASCIMENTO, S.C.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; Antitumor activity of *Cratylia mollis* lectin encapsulated into liposomes. *Int J Pharm.*, v. 8; n. 278, p. 435-45, 2004.

ASSREUY, A.M.S.; ALENCAR, N.M.N.; CAVADA, B.S.; ROCHA-FILHO, D.R.; FEITOSA, R.F.; CUNHA, F.Q.; CALVETE, J.J.; RIBEIRO, R.A.; Porcine Spermadhesin PSP-I/PSP-II Stimulates Macrophages to Release a Neutrophil Chemotactic Substance: Modulation by Mast Cells. *Biol. of Reprod.*, v. 68, p. 1836-1841, 2003.

ASSREUY, A.M.S. ; CALVETE, J.J.; ALENCAR, N.M.N.; CAVADA, B.S.; ROCHAFILHO, D.R.; MELO, S.C. ; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A.; The spermadhesin PSP-I/PSP-II heterodimer and its isolated subunits induced neutrophil migration into the peritoneal cavity of rats. *Biology of Reproduction, Estados Unidos*, v. 67, n. 6, p. 1796-1803, 2002.

ASSREUY, A.M.S.; MARTINS, G.J.; MOREIRA, E.E.F.; BRITO, G.A.C.; CAVADA, B.S.; RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A.; Prevention of Cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis by glucose-mannose binding plant lectins. *J. Urol.*, v.161, p. 1988-93, 1999.

ASSREUY, A.M.S.; SHIBUYA, M.D.; MARTINS, G.J.; SOUZA, M.L.P.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. *Mediators Inflamm.*, v. 6, p. 201-210, 1997.

BACON, K.B.; OPPENHEIM, J.J.; Chemokines in disease models and pathogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*, v. 9, p.167-173, 1998.

BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B.S.; RODRIGUES, L.A.; GRANGEIRO, T.B.; BARRAL-NETO, M.; Lymphocyte activation and apoptosis induction in BALB/c mice treated with plant lectins. *Memórias do Inst. Oswaldo Cruz*, v. 96, n 5, p. 673-678, 2001.

BARONDES, S.H.; Biofunctional properties of lectins: lectins redefined. *Trends Biochem. Sci.*, v. 13, p. 480-482, 1998.

BARRAL-NETTO, M.; SANTOS, S.B.; BARRAL, A.; MOREIRA, L.I.M.; SANTOS, C.F.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S.; Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the *Diocleae* tribe. *Immun. Invest.*, v. 21, n. 4, p. 297-303, 1992.

BENTO, C.A.M.; CAVADA, B.S.; OLIVEIRA, J.T.A.; MOREIRA, R.A.; BARJA-FIDALGO, C. Rat paw edema and leukocyte emigration induced by plant lectins. *Ag. Actions*, v. 38, p. 48-54, 1993.

BEUTH, J.; KO, H.L.; PULVERER, G.; UHLENBRUCK, G.; Importance of lectins for the prevention of bacterial infection and cancer metastases. *Glycoconjugate J.*, v. 12, p. 1-6, 1995.

BOXER, L.A.; Distúrbio da função dos fagócitos. (In). GOLDMAN, L.; BENNETT, J.C. (Eds). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, p 1013-1022, 2001.

BOYD, W.C.; SHAPLEIGH, E.; Diagnosis by subgroups of blood groups A and AB by use of plant agglutinins (lectins). *J Lab Clin Med.* v. 44, n. 2, p. 235-7, 1954.

BOYDEN, S.; The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.*, v. 115, p. 543-466. 1962

BRODIE, D.H.; Inflammatory cells: structure and function. In: STITTES, D.D., TERR, A.I. (Ed). *Basic and clinical immunology*. Norwalk, Conn.: Apleton & Lange. p. 141-183, 1991.

BROWN, E.J. Adhesive interaction in the immune system. *Cell Biology*, v. 7, p.289-295, 1997.

CALIXTO, J.B.; Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin América. A personal view. *J. Ethnopharmacol.*, v.100, p.131-134, 2005.

CALVETE, J.J.; MORENO-MURCIANO, M.P.; THEAKSTON, R.D.; KISIEL, D.G.; MARCINKIEWICZ, C.; Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. *Biochem J.* v.15, p. 725-34, 2003.

CANETTI, C.A.; LEUNG, B.P.; CULSHAW, S.; CUNHA, F.Q.; Liew. IL-18 enhances collagen-induced by recruiting neutrophils via TNF-alpha and leukotriene B4. *J Immunol* v.171, p.1009-1015, 2003.

CAVADA, B.S.; IGLESIAS, M.M.; TRONCOSO, M.F.; TEIXEIRA, E.H.; TURYN, D.; DOMINICI, F.P. Glucose-mannose-binding lectins isolated from Brazilian beans

stimulate the autophosphorylation of the insulin receptor *in vitro*. *Horm Metab Res.*, v. 35, n. 2, p.125-7, 2003.

CAVADA, B.S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S. GRANGEIRO, T.B.; BARRAL-NETO, M.; Revisiting Proteus: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological use of the Diocleinae subtribe lectins. *Curr Prot Peptide Science*, v. 2, n. 2, p. 123-135, 2001.

CAVADA, B.S.; BARBOSA, T.; RAMOS, M.V.; CORDEIRO, E.F.; OLIVEIRA, R.A.; MOREIRA R.E.; Isolation and partial characterization of a lectin from *Dioclea rostrata* benth seeds. *R. Bras. Fisiol. Veg*, v. 8, p. 31-36, 1996.

CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, R.A.; GRANGEIRO, T.B.; Primary structures and functions of plant lectins. *R. Bras. Fisiol. Veg*, v. 5, p. 193-201, 1993.

CIRINO, G.; FIORUCCI, S.; SESSA, W.C.; Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation? *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 24, n. 2, p. 91-94, 2003.

COELHO-CASTELO, A.A.M.; PANUNTO-CASTELO, A.; MORENO, A.N.; DIAS-BARUFFI, M.D.; JAMUR, M.C.; OLIVER, C.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; RODRIGUES, V.; Sm60, a mannose-binding protein from *Schistosoma mansoni* with inflammatory property. *International Journal of Parasitology*, v. 32, p. 1747-1757, 2002.

COLLETTI, L.M.; KUNKEL, S.L.; WALZ, A.; BURDICK, M.D.; KUNKEL, R.G.; WILKE, C.A.; STRIETER, R.M.; Chemokine expression during hepatic ischemia/reperfusion-induced lung injury in the rat. The role of epithelial neutrophil activating protein. *J Clin Invest*, v. 95, p.134-141, 1993.

COLOMBO, A.V.; HIRATA, R.J.R.; DE SOUZA, C.M.; MONTEIRO-LEAL, L.H.; PREVIATO, J.O.; FORMIGA, L.C.; ANDRADE, A.F.; MATTOS-GUARALDI, A.L.; *Corynebacterium diphtheriae* surface proteins as adhesions to human erythrocytes. *FEMS Microbiol Lett*, v. 13, n. 2, p. 235-239, 2004.

CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, P.; ROBBINS; *Pathologic Basics of Disease*. 6 ed. Saunders Company, New York. Cap III 48-83, 1999.

CUNHA, F.Q.; ASSREUY, J.; MONCADA, S.; LIEW, F.Y.; Phagocytosis and induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Immunology*, v. 79, p.408-411, 1993.

CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H.; The release of a neutrophil factor from peritoneal macrophage by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. *Eur. J. Pharmacol.* v. 29, n.1-2, p. 65-76, 1986.

DELATORRE, P.; NASCIMENTO, K.S.; MELO, L.M.; SOUZA, E.P.; ROCHA, B.A. M.; BENEVIDES, R.G.; OLIVEIRA, T. M. ; BEZERRA, G.A.; FREIRE, V.N.; CAVADA, B.S.; Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the lectin from *Dioclea rostrata* Benth seeds. *Acta Crystallographica F*, Dinamarca, v. 62, p. 166-168, 2006.

Di ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A.; Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenin and turpentine. *J. Pathol.*, v. 104, p. 15-29, 1971.

FREIRE, M.G.; DESOUZA, I.A.; SILVA, A.C.; MACEDO, M.L.; LIMA, M.S.; TAMASHIRO, W.M.; ANTUNES, E.; MARANGONI, S.; Inflammatory responses induced in mice by lectin from *Talisia esculenta* seeds. *Toxicon.*, v. 42, n. 3, p. 275-80, 2003.

GADELHA, T.S.; GADELHA, C.A.; ARAGÃO, K.S.; OLIVEIRA, C.C.; MOTA, M.R.L.; GOMES, R.C.; DE FREITAS, P.A.; TOYAMA, M.H.; DE OLIVEIRA, T.D.; ALENCAR, N.M.N.; CRIDDLE, D.N.; ASSREUY, A.M.S.; CAVADA, B.S.; Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin.. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 350, p. 1050-1055, 2006.

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

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

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R.; Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* v. 126, p. 131-138, 1982.

GRESPLAN, R.; Participação das quimiocinas CXCL1 (KC) e CXCL5 (LIX) e do LTB<sub>4</sub> na migração de neutrófilos para a cavidade articular em modelo de artrite induzida por mBSA (Dissertação de Mestrado). USP- 2006.

HASEGAWA, N.; KIMURA, Y.; ODA, T.; KOMATSU, N; MURAMATSU, T.; Isolated ricin B-chainmediated apoptosis in U937 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* v. 64, p. 1422-1429, 2000.

HOSTANSKA, K.; VUONG, V.; ROCHA, S.; SOENGAS, M.S.; GLANZMANN, C.; SALLER, R.; BODIS, S.; PRUSCHY, M.; Recombinant mistletoe lectin induces p53-independent apoptosis in tumour cells and cooperates with ionising radiation. *Br J Cancer.* v. 88, n. 11, p.1785-92, 2003.

IMBERTY, A.; GAUTIER, C.; LESCAR, J.; PEREÉZ, S; An Unusual Carbohydrate Binding Site Revealed by the Structures of Two *Maackia amurensis* Lectins Complexed with Sialic Acid-containing Oligosaccharides. *Journal Biol. Chem.* 275, p. 17541-48. 2000.

JANEWAY, J.C.; TRAVERS, P.; The systemic immunologic in diseases. London: 2006. Cap 2

JOHNSTON, B.; BUTCHER, E.C.; Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. *Semin Immunol.* v . 14, p. 83-92, 2002.

JUNQUEIRA, L.C.U., CARNEIRO, J.; *Histologia básica.* 6ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 237-251, 1987.

KAKKAR, A.K.; LEFER, D.J.; Leukocyte and endothelial adhesion molecule studies in knockout mice. *Current Opnion in Pharmacology*, v. 4, p. 154-158, 2004.

KANKURI, E.; VAALI, K.; KORPELA, R.; PAAKKARI, I.; VAPAATALO, H.; MOILANEN, E. *Inflammation.* v. 25, n. 5, p. 301-10, 2001.

KASAMA, T.; MIWA, Y.; ISOZAKI, T.; ODAI, T.; ADACHI, M.; KUNKEL, S.L.; Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. v. 4, p.273-279, 2005.

KILPATRICK, D.C.; Mechanisms and assessment of lectin-mediated mitogenesis. *Molecular Biotechnology*. v. 11, p. 55-65, 1999.

KIM, T.W.; MOON, H.B.; KIM, S.J. Interleukin-10 is up-regulated by prolactin and serum-starvation in cultured mammary epithelial cells. *Mol Cells*. v. 31, n. 16, p. 168-72, 2003.

KLEBANOFF, S.J. Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians*, v. 111, p. 383-389, 1999.

KOLB, H.; KOLB-BACHOFEN, V.; Nitric oxide in autoimmune disease: cytotoxic or regulatory mediator. *Immunology today*. v.19, p.556-561.1998.

KOSHLAND, D.E.; The molecule of the year. *Molecular Biotechnology*. p.1258-1261, 1992.

KUBES, P.; JULITA, M.; PAYNE, D.; Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia/reperfusion. *J Clin Invest.* v.6, p. 2510–2519, 1995.

LANDUCCI, E.C.T.; ANTUNES, E.; DONATO, J.L.; FARO, R.; HYSLOP, S.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; De NUCCI, G.; Inhibition of carrageenin - induced rat paw oedema by crotapotin, a polypeptide complexed with phospholipase A2. *Br. J. Pharmacol.*, v. 114, p. 578-583, 1995.

LORIS, R.; Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1572, p. 198-208, 2002.

MACIEL, E.V.; ARAUJO-FILHO, V.S.; NAKAZAWA, M.; GOMES, Y.M.; COELHO, L.C.; CORREIA, M.T. Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals*. v. 32, n. 1, p. 57-60, 2004.

MANTOVANI, A.; Chemokines. Introduction and overview. *Chem Immunol*. v. 72, p. 1-6, 1999.

MATSUDA, H.; MORIKAWA, T.; ANDO, S.; TOGUCHIDA, I.; YOSHIKAWA, M. Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. *Bioorg Med Chem.* v. 11, p. 1995-2000, 2003.

MILLER, M.D.; KRANGEL, M.S.; Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit Rev Immunol.* v. 12, p.17-46, 1992.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A.; Nitric oxide physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharm. Rev.* v. 43, p. 109-142, 1994.

MORALE, A.; CONIGLIO, L.; ANGELINE, C.; CIMOLI, G.; BOLLA, A.; ALLETEIO, D.; RUSSO, P.; FALLUGI, C.; Biological effects of a neurotoxic pesticide at low concentrations on sea urchin early development. A terathogenic assay. *Chemosphere*, 37: 3001, 1998.

MOREIRA, A.L.; SAMPAIO, E.P.; ZMUIDZINAS, A.; FRINDT, P.; KENDAL, A.; KAPLAN,G.; Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor  $\alpha$  enhancing mRNA degradation. *J. Exp. Med.* v.177, p. 1675-1680, 1993.

MOREIRA, R.A.; AINOUIZ, I.L.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S.; Plant lectins, chemical and biological aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 86, p. 211-218, 1991.

MOTA, M.R.L.; CRIDDLE, D.N.; ALENCAR, N.M.N.; GOMES, R.C.; MEIRELES, A.V.P.; GADELHA, T.S.; GADELHA, C.A.; OLIVEIRA, C.C.; BENEVIDES, R.G.; CAVADA, B.S.; ASSREUY, A.M.S.; 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.

MULLIGAN, M.S.; PAULSON, J.C.; FREEST, S.; ZHENG, Z.;LOWE, J.B.; Protective effects of oligosaccharides in P-selectin-dependent lung injury. *Search Journal Nature.* v. 364, p. 149-151, 1993.

MURAI, M.; YONEYAMA, H.; HARADA, A.; YI, Z.; VESTERGAARD, C.; GUO, B.; SUZUKI, K.; ASAKURA, H.; MATSUSHIMA, K.; Active participation of CCR5(+)CD8(+) T lymphocytes in the pathogenesis of liver injury in graft-versus-host disease. *J Clin Invest.* v. 104, p. 49-57,1999.

MUTZE, S.; HEBLING, U.; STREMMEL, W.; WANG, J.; ARNHOLD, J.; PANTOPOULOS, K.; MUELLER, S. Myeloperoxidase-derived hypochlorous acid antagonizes the oxidative stress-mediated activation of iron regulatory protein 1. *J. Biol Chem.* v. 278, p. 40542-405429, 2003.

NAPIMOGA, M.H.; CAVADA, B.S.; ALENCAR, N.M.N.; MOTA, M.R.L.; BITENCOURT, F.S.; ALVES-FILHO, J.C.; GRESPAN, R.; GONÇALVES, R.B.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J.T.; FREITAS, A.; PARADA, C.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. *Lonchocarpus sericeus* lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokine and chemokines production. *International Immunopharmacology*, ( In press) 2007.

NATHAN, C.; Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Fed. Am.Soc. Exp. Biol. J. V.* 6, p. 3051-3053, 1992.

OHTA, Y.; KOBAYASHI, T.; INUI, K.; YOSHINO, J.; NAKASAZAWA, S. Protective effect of teprenone against acute gastric mucosal lesions induced by compound 48/80, a mast cell degranulator, in rats. *J Pharmacol Sci.* v. 93, n. 3, p. 337-46, 2003.

PARK, R.; KIM, M.S.; SO, H.S.; JUNG, B.H.; MOON, S.R.; CHUNGF, S.Y.; KO, C.B.; KIM, B.R.; CHUNG, H.T.; Activation of c-Jun N-terminal kinase 1(JNK 1) in mistletoe lectin II-induced apoptosis of human myeloleukemic U937 cells. *Biochem. Pharmacol.* v .60, p.1685-1691, 2000.

PELAIA, G.; VATRELLA, A.; CUDA, G.; MASELLI, R.; MARSICO, S.A. Molecular mechanisms of corticosteroid actions in chronic inflammatory airway diseases. *Life Sci.* v. 72, p. 1549-1561, 2003.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M.; Plant lectins: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. In: *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews.* v. 15, p.199-228, 1998.

PHILIP, M.; ROWLEY, D.A.; SCHEREIBER,H.; Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. In: *Seminars in Cancer Biology.* v.14 p. 433-439, 2004.

PROUDFOOT, A.E.; POWER, C.A.; ROMMEL, C.; Wells T.N.; Strategies for chemokine antagonists as therapeutics. Review. *Semin Immunol.* v. 15, p. 57-65, 2003.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; THOMAZZI, S.M.; PASCHOALATO, A.B.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur J Pharmacol.* v. 11, p. 111-118, 2000.

RIBEIRO, R.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Recombinant gamma interferon causes neutrophil migration mediated by the release of a macrophage neutrophil chemotactic factor. *Int J Exp Pathol.* v. 71, n. 5, p. 717-25, 1991.

ROBBINS, S.S.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; Pathologic basis of diseases. Philadelphia: Saunders W.B., Cap 3: inflammation and repair, 2004.

SCHMIDT, H.W.; WALTER, U.; NO at work. *Cell.* v. 78, p.919-925, 1994.

SEDGWICK, D.; WILLOUGHBY, D.A.; Initiation of inflammatory response and its prevention. In: BONTA, I.L.; BRAY, M.A.; PARNHAM, M.J. *Handbook of Inflama.* Elsevier. v. 5, p. 25-47, 1985.

SHARON, N.; LIS, H. *Lectins, Second Edition.* Dordresh/Ntherlands. Kluwer Academic Publishers. 2003.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. *Articles*, v.13, p. 272-233, 1989.

SHARON, N.; LIS, H.; Lectins: cells agglutinating and sugar-specific proteins. *Science.* v. 177, p. 949-958, 1972.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammation response. *Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.* v.18, n.3, p. 385-405, 2004.

SHLYAKHOVENKO, V.A.; KOZAK, V.V.; VINARCHUK, M.P.; Expression of lectin receptors in sites Ehrlich tumor cells under modified polyamine levels. *Exp. Oncol.* v. 17, p. 119-123, 1995.

SINGH, R.S.; TIWARY, K.; KENNEDY, J.F. Lectins: sources, activities and applications. *Crit. Rev. in Biotech.* v. 19, n. 2, p. 145-178, 1999.

SOMMER, C.; KRESS, M.; Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci. Lett.*, v.361, p.184-187, 2004.

SOUSA, C.A.M.; FERREIRA, S.H.; Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. *Agents Actions.*, v. 17, n. 1, p. 97-103, 1985.

SOUZA, D.G.; CASSALI, G.D.; POOLE, S.; Effects of inhibition of PDE4 and TNF- $\alpha$  on local and remote injuries following ischaemia and reperfusion injury. *Br J Pharmacol*, v.134, p. 985–994, 2001.

STOOLMAN, L.M.; AND ROSEN, S.D.; A possible role for a cell surface carbohydrate binding molecule in lymphocyte recirculation. *J. Cell Biol.* v. 96, p. 722, 1983.

TAKTAK, Y.S.; SELKIRK, S.; BRISTOW, A.F.; CARPENTER, A.; BALL, C.; RAFFERTY, B.; POOLE, S. Assay of pyrogens by interleukin-6 release from monocytic cell lines.. *J. Pharmacol.* v. 43, p. 578–582, 1991.

THOMPSON, D.C.; PORTER, S.E.; BAUER, A.K.; Cytokine-induced nitric oxide formation in normal but not in neoplastic murine lung epithelial cell lines. *American Journal Physiology.* v. 274, p.L922-L932, 1998.

VAN DAMME, E.J.M., BARRE, A., ROUGÉ, P. PEUMANS, W.J.; Plant Lectins: Cytoplasmic/nuclear plant lectins: a new story. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 9, n. 10, p. 484-489, 2004.

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

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

VERRI, W.A.; CUNHA, T.M.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H.; Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? *Pharmacology Therapeutics*. v.112 p. 116-138, 2006.

VICENTE-MANZANARES, M.; SÁCHEZ-MARDID, F.; Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat. Rev. Immunol*, v. 4, p. 110-122, 2004.

VILCEK, J.; FELDMAN, M.; Historical review: cytokines as therapeutic and targets of therapeutics. In *trends Pharmacologic sciences*. v.25, n. 4, p. 201-209, 2004.

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

WELLE, M.; Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J Leukoc Biol*. v. 61, n. 3, p. 233-45, 1997.

WINTERBOURN, C.C.; VISSERS, M.C.; KETTLE, A.J. Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol*, v. 7, p. 53-58, 2000.

YAMAMOTO, K.; KONAMI, Y.; KUSUI, K.; OSAWA, T.; Purification and characterization of a carbohydrate-binding peptide from *Bauhinia purpurea* lectin. *FEBS Letters*, v. 281(12), p. 258-262, 2001.

YOKOYAMA, C.; TANABE, T.; Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxidase synthase and primary structure of enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 1665, p. 3746-3752, 1989.